

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



543 078

(43) 国際公開日
2004 年 9 月 16 日 (16.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/078974 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11,
A61K 31/7105, A61P 31/14, A61K 48/00

[JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000605

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 23 日 (23.01.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-016750 2003 年 1 月 24 日 (24.01.2003) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人東京都医学研究機構 (TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒1638001 東京都新宿区西新宿二丁目8番1号 Tokyo (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 道法 (KOHARA, Michinori) [JP/JP]; 〒1140014 東京都北区田端3-15-3-408 Tokyo (JP). 渡邊 綱正 (WATANABE, Tsunamasa) [JP/JP]; 〒1130021 東京都文京区本駒込4-16-13-203 Tokyo (JP). 多比良 和誠 (TAIRA, Kazunari) [JP/JP]; 〒3050046 茨城県つくば市東2-4-3 Ibaraki (JP). 宮岸 真 (MIYAGISHI, Makoto) [JP/JP]; 〒2701166 千葉県我孫子市我孫子121-1 スカイビル 我孫子503号室 Chiba (JP). 須藤 正幸 (SUDO, Masayuki)

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: OLIGORIBONUCLEOTIDE OR PEPTIDIC NUCLEIC ACID INHIBITING FUNCTION OF HEPATITIS C VIRUS

(54) 発明の名称: C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

(57) Abstract: It is intended to provide a method of inhibiting the replicability of hepatitis C virus (HCV). An oligoribonucleotide or a peptidic nucleic acid which sequence-specifically binds to HCV-RNA; and a remedy for hepatitis C containing the same as the active ingredient.

(57) 要約: C型肝炎ウイルス (HCV) の複製能を阻害する方法を提供する。HCV-RNAに対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸、これらを有効成分とするC型肝炎治療剤を提供する。

WO 2004/078974 A1

明 細 書

C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸、該オリゴリボヌクレオチドを発現するベクター、これらを有効成分とするC型肝炎治療剤、並びに該オリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸をC型肝炎ウイルスのRNAに結合させてウイルスの複製能を阻害する方法に関する。

背景技術

C型肝炎ウイルス（以下「HCV」という）は、輸血後の非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスであり、その遺伝子のcDNAは1989年にクローニングされた。これまでにクローニングされた遺伝子cDNAを用いてHCVに関する多くの研究が行われており、特に感染予防ならびに診断法の確立など社会的に重要な成果が達成され、現在では輸血後のHCV感染はほとんど認められない状況に至っている。しかしながら、世界中のHCV感染者数は全人口の数%にもおよぶとされている。

HCV感染に起因する肝炎は長期慢性化する特徴があり、これに伴い慢性肝炎を引き起こし、その後肝硬変、さらに肝癌に移行する割合が非常に高いことが知られており、HCV感染後の肝炎の確実な治療が重要な課題となっている。

C型慢性肝炎の治療法については、インターフェロン（IFN）療法が広く施行されているが、有効率が約30%であること、高頻度に発熱などの副作用が誘導されること、高薬価であることなどの問題が存在している。IFNの種類、用法・用量の検討もなされ、コンセンサスIFNの開発などにより有効率の向上も期待され、また、IFNとリバビリンなどの抗ウイルス剤の併用による治療も試みられているが、現在までのところいずれも確実な治療法には至っていない。

一方、近年、動物の生体内における細胞内での特定の遺伝子の発現を抑制する方法として、標的遺伝子に対する二本鎖RNAを用いて標的遺伝子の発現を抑制

する方法が見出された(Fire A ら、Nature 1998 年 391 巻 p.806-811)。この方法はRNAインターフェアランス(RNAi)と呼ばれ、二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入した際に、そのRNA配列に対応する細胞内のmRNAが特異的に分解され、そのmRNAによってコードされる蛋白質が発現されなくなる現象をいう。RNAiは、新規遺伝子の機能を遺伝子発現阻害により調べる上で有効な方法であり、線虫、ショウジョウバエなどで遺伝子機能解析に盛んに用いられている。

しかし、RNAiが病気の治療、特にC型肝炎などのウイルス性疾患の治療に有効であるか否かは不明であった。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、HCVのRNA(HCV-RNA)に対して配列特異的に結合するオリゴボヌクレオチド(以下「オリゴRNA」ということもある)またはペプチド核酸が、HCVの複製を阻害することを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下の(1)～(13)を提供する。

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)のRNAに対して配列特異的に結合するオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (2) HCVのRNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、上記(1)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (3) HCVのRNAの5'非翻訳領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする、上記(1)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (4) 遺伝子型の異なる複数種のHCVの遺伝子配列において、同一性の高い領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする、上記(1)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (5) 二本鎖RNAである、上記(1)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (6) 鎖長が19～23bpである、上記(1)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- (7) 配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴボヌクレ

オチド。

(8) 上記(7)に記載のオリゴボヌクレオチドと相補的な配列を有するHCVのRNA領域、あるいは該オリゴボヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴボヌクレオチド。

(9) 配列番号47～55に示すヌクレオチド配列において連続する19～23塩基からなるヌクレオチド配列で示されるオリゴボヌクレオチド。

(10) 上記(9)に記載のオリゴボヌクレオチドと相補的な配列を有するHCVのRNA領域、あるいは該オリゴボヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴボヌクレオチド。

(11) (1)～(10)に記載のオリゴボヌクレオチドを発現するベクター。

(12) (1)～(10)に記載のオリゴボヌクレオチド若しくはペプチド核酸、または(11)に記載のベクターを有効成分とするC型肝炎治療剤。

(13) (1)～(10)に記載のオリゴボヌクレオチドまたはペプチド核酸をHCV-RNAに結合させて、HCVの複製能を阻害する方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2003-016750号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、HCV-RNAの5'側の非翻訳領域における一般的な二次構造を示す。

図2は、HCV-RNAの3'側の非翻訳領域における一般的な二次構造を示す。

図3Aは、HCVの分離株HCV-1、HCV-BK、HCV-JのRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。

図3Bは、HCVの分離株R6、R24、S14JのRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。

図3Cは、HCVの分離株HCJ6、JFH1、JCH1のRNAの5'側の非翻訳領域から

コア領域の 500 塩基についての cDNA 配列を示す。

図 3 D は、H C V の分離株 JCH3 及び HCJ8 の RNA の 5' 側の非翻訳領域からコア領域の 500 塩基についての cDNA 配列を示す。

図 4 A は、各種 H C V の 5' 非翻訳領域からコア領域の 500 塩基についてのマルチプルアライメントの結果の一部を示す。

図 4 B は、各種 H C V の 5' 非翻訳領域からコア領域の 500 塩基についてのマルチプルアライメントの結果（図 4 A の続き）を示す。

図 4 C は、各種 H C V の 5' 非翻訳領域からコア領域の 500 塩基についてのマルチプルアライメントの結果（図 4 B の続き）を示す。

図 5 A は、pH77J6S、R6、R24L、R24S の RNA の 3' 側の非翻訳領域についての cDNA 配列を示す。

図 5 B は、HCJ6CH、JFH1、JCH1、2b_AB030907 の RNA の 3' 側の非翻訳領域についての cDNA 配列を示す。

図 6 は、siRNA 添加と Rz-HepM6 細胞株が産生する H C V コアタンパク量との関係を示す。

図 7 は、siRNA 添加と H C V レプリコンが複製する活性との関係を示す。

図 8 は、ダイサー処理で調製した siRNA の添加と H C V レプリコンが複製する活性との関係を示す。

図 9 は、ダイサー処理で調製した siRNA の添加と H C V レプリコンが複製する活性との関係を示す。

発明を実施するための形態

本発明の H C V-RNA に対して配列特異的に結合するオリゴ RNA は、糖としてリボースを有するオリゴヌクレオチドであり、塩基としては、天然の RNA 中に存在するアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの他、チミン、並びに他の修飾塩基等を含むものも包含する。本発明のオリゴ RNA は、H C V-RNA に配列特異的に結合可能なオリゴ RNA であれば特に制限されないが、H C V の複製能を阻害するオリゴ RNA であることが好ましい。H C V-RNA に配列特異的に結合可能なオリゴ RNA としては、例えば、H C V-RNA の配列と相補的な配列

を有するオリゴRNA、HCV-RNAの配列と相補的な配列と高い同一性を示す配列を有するオリゴRNA、HCV-RNAの配列を有するRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なオリゴRNA等を挙げることができる。尚、本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、本発明の好ましい一態様である siRNA は、細胞内で標的遺伝子にハイブリダイズしてダイサーを介して標的遺伝子を切断するものであり、標的遺伝子は 19～23nt の長さに切断され则认为られている。一方、本発明の他の態様であるアンチセンス核酸は、標的遺伝子にハイブリダイズして IFN を誘導し、RNase を活性化することによって標的遺伝子を分解すると考えられる。あるいは、結合によって標的RNAの構造変化を起こして翻訳を阻害すると考えられている。また、本発明において、HCV-RNA の配列とは、HCV のゲノムRNA（一鎖）の配列、ゲノムRNAから転写された mRNA（+鎖）の配列のいずれでも良いが、好ましくは+鎖の配列である。

尚、本明細書において、siRNA とは、オリゴRNAの中でも、その長さが 19～23nt（19～23bp）のものをいう。siRNA が二本鎖を形成している場合、一方または双方が突出末端を有していても良い。

本発明において高い同一性とは、70%以上の同一性であり、好ましくは80%以上の同一性であり、さらに好ましくは90%以上の同一性（例えば95%以上の同一性）である。塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) 等によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

ハイブリダイゼーション技術は当業者によく知られた技術であり（例えば Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor

Lab. press, 1989、など)、ストリンジェントな条件も当業者であれば適宜選択することが可能である。ストリンジェントな条件の例としては、例えば、ハイブリダイゼーション後の洗浄において 42℃、5×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50℃、5×SSC、0.1%SDS の条件であり、さらに好ましくは 65℃、0.1×SSC 及び 0.1%SDS の条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

本発明のオリゴRNAは一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、又、さらに二本以上の複数の鎖から形成されていてもよいが、好ましいのは二本鎖である。二本鎖は独立した2本の鎖から形成されていてもよいし、又、自己相補的な一本鎖RNA中で形成される二本鎖であってもよく、この場合、一分子でステムループ構造を形成することができる。オリゴRNAが二本鎖の場合、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域（例えば両末端又は片方の末端など）が一本鎖等の他の構造を形成していてもよい。

本発明のオリゴRNAは、HCV-RNAへの配列特異的結合能を有していればよく、その長さは限定されない。本発明のオリゴRNAの長さとしては、例えば、5～1000塩基（二本鎖の場合には、5～1000bp）であり、好ましくは10～100塩基（二本鎖の場合には、10～100bp）であり、さらに好ましくは15～25塩基（二本鎖の場合には、15～25bp）であり、特に好ましくは19～23塩基（二本鎖の場合には、19～23bp）である。

本発明において好ましいオリゴRNAは、配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴRNAであり、特に好ましいものとして配列番号20～25に示すヌクレオチド配列を有するオリゴRNAが挙げられる。また、本発明において好ましい他のオリゴRNAとして、配列番号47～55に示すヌクレオチド配列における連続した19～23塩基からなるヌクレオチド配列で示されるオリゴRNAが挙げられる。

本発明において好ましい更に他のオリゴRNAとして、例えば上記配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴRNAと相補的な配列を有する

HCVのRNA領域、あるいは該オリゴRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴRNA、及び上記配列番号47～55に示すヌクレオチド配列における連続した19～23塩基からなるヌクレオチド配列で示されるオリゴRNAと相補的な配列を有するHCVのRNA領域、あるいは該オリゴRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴRNAが挙げられる。当業者であれば、これらのオリゴRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域を任意のHCV種において容易に決定することができる。これらのオリゴRNAの例として、例えば上記配列番号20～34に示すヌクレオチド配列、あるいは上記配列番号47～55に示すヌクレオチド配列における連続した19～23塩基からなるヌクレオチド配列において、7個以下、好ましくは5個以下、より好ましくは3個以下のヌクレオチドが欠失、置換、付加されたヌクレオチド配列からなり、かつHCVのRNAとハイブリダイズすることによってHCVの複製を阻害し得るものが挙げられる。

また、本発明において好適に使用できるペプチド核酸として、本発明において好適に使用できるオリゴRNAと対応する塩基配列を有するペプチド核酸が挙げられる。

HCVのRNAは、約340ヌクレオチドの5'側の非翻訳領域(5'非翻訳領域)、約9400ヌクレオチドからなるオープン・リーディング・フレーム(ORF)、約50ヌクレオチドからなる3'側の非翻訳領域(3'非翻訳領域)で構成されている。このRNA配列中、本発明のオリゴRNAがターゲットとする部位は特に限定されず、どの部位でもよいが、好ましくは5'非翻訳領域～ORFの5'末端領域(例えば、配列番号1～11に示す塩基配列を有する領域)、3'非翻訳領域(例えば、配列番号12～19に示す塩基配列を有する領域)であり、特に好ましくは5'非翻訳領域である。

HCV-RNAの5'非翻訳領域には、インターナル・リボソーム・エントリー・サイト(Internal Ribosomal Entry Site : IRES)やステムループを形成するステム領域などが存在する。HCVの5'非翻訳領域やIRES、ステム領域については

既に多くの報告がある(Kato. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 9524-9528, (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 2451-2455, (1991)、J. Virol., 65, 1105-1113, (1991)、J. Gen. Virol., 72, 2697-2704, (1991)、Virology, 188, 331-341, (1992)、Tsukiyama. Kohara. et al., J. Virol., 66, 1476-1483, (1992)、Honda Masao. et al., J. Virol., 73, 1165-1174, (1999)、Honda Masao et al., RNA, 2(10), 955-968, (1996)、Sasano T. et al., Genome Inf. Ser., 9, 395-396, (1998)、Ito T et al., J. Virol., 72, 8789-8796, (1998)、Kamoshita N et al., Virology., 233, 9-18, (1997)、など)。図1及び図2に、HCV-RNAの5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域における一般的な二次構造を示す。

また、HCVには遺伝子型の異なる複数種のHCVが存在する。そのようなHCVの例としては、例えば、HCJ6、HCJ8、HCV-1、HCV-BK、HCV-J、JCH1、JCH3、JFH1、R24、R6、S14J、pH77J6S (GenBank Accession no. AF177039)、HCJ6CH、2b_AB030907などが挙げられる。このような遺伝子型の異なる複数のHCV-RNAに対応する為には、遺伝子型の異なる複数種のHCV遺伝子配列の中で同一性が高い領域をターゲットにすることが好ましい。ここで、遺伝子型の異なる複数のHCV遺伝子配列の中で同一性が高い領域とは、複数種のHCVのRNA配列が互いに80%以上の同一性、好ましくは90%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する領域である。そのような領域は、10塩基以上の長さを有していることが好ましく、さらに好ましくは15塩基以上、特に好ましくは20塩基以上の長さを有する。ここで、複数種のHCVとは、通常、3種類以上のHCV、好ましくは5種類以上、特に好ましくは10種類以上のHCVのことをいう。遺伝子配列の同一性は、対象となる複数種の遺伝子の配列を比較し、上述したアルゴリズム等を用いて計算することができる。

本発明で用いられるオリゴリボヌクレオチドは、修飾されていない通常のRNAの構成を有するものの他に、リン酸ジエステル部や糖部などを修飾した修飾RNAなどを用いることも可能であり、特に限定されるものではない。又、本発明のオリゴRNAは、その一部分にデオキシリボヌクレオチドなどのリボヌクレオチドでない分子を含んでいてもよい。

また、本発明においては、オリゴRNAの代わりにペプチド核酸(PNA)な

どを用いてもよい。PNAは当業者によく知られた技術であり(Nielsen Peter E., Methods in Molecular Biology, 208, 3-26, (2002)、Braasch Dwaine A et al., Biochemistry, 41(14), 4503-4510, (2002)、Koppelhus Uffe et al., Antisense Drug Technology, 359-374, (2001)、Nielsen Peter E., Methods in Enzymology, 340, 329-340, (2001))、上記オリゴRNAと同様に、配列特異的にHCV-RNAに結合し得るものを製造できる。本発明において好適なペプチド核酸の長さとしては、例えば、5~1000 塩基(二本鎖の場合には、5~1000bp)であり、好ましくは 10~100 塩基(二本鎖の場合には、10~100bp)であり、さらに好ましくは 15~25 塩基(二本鎖の場合には、15~25bp)であり、特に好ましくは 19~23 塩基(二本鎖の場合には、19~23bp)である。

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸は当業者に公知の方法で作製することが可能である。

本発明のオリゴRNAを継続的に発現させる場合には、本発明のオリゴRNAを発現するベクターを作製してもよい。ベクターは当業者に公知の方法で作製することが可能である。例えば、Nature Biotech (2002) 19, 497-500 に記載されたもの等の公知のベクターに本発明のオリゴRNAをコードする遺伝子を導入することにより作製することが可能である。本発明のオリゴRNAの発現のために好適なプロモーターとしては、特に限定するものではないが、T7 プロモーター、tRNA プロモーター、U6 プロモーター等が挙げられる。

本発明のオリゴRNAは、HCVの複製を阻害し、HCVの増殖を抑制することが可能であるので、C型肝炎の治療剤として有用である。この場合、複数種類のHCVに対応するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸を提供することで、臨床の場において患者が感染しているウイルスの型を同定することなく治療でき、また複数種のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸を混合して用いる必要もなくなるので好ましい。

治療に用いる場合、細胞内でそのまま機能し得る形態で投与することもできる。この場合、オリゴRNAまたはペプチド核酸の長さは 19~23 塩基程度とすることが最適である。また細胞内のプロセッシングを経て機能し得るものを投与することもできる。この場合には、目的とする配列を含むより長い配列を有するオリゴR

NAまたはペプチド核酸を投与することができる。細胞内に取り込まれた二本鎖RNA (dsRNA) はダイサー (Dicer) と呼ばれる酵素によって 21mer 前後に分解されて siRNA (short-interfering RNA) となり、RISC (RNA-induced Silencing Complex) と呼ばれる複合体を作り、ゲノムから転写された特定の塩基配列を持った RNA を破壊すると考えられている (Bernstein, E. ら, Nature, 409:363-366, 2001; Hammond, S.M. ら, Nature, 404:293-296, 2000)。あるいはまた、市販のダイサーを用いて予め siRNA を in vitro で調製して用いることもできる。

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸を有効成分とするC型肝炎治療剤は、必要に応じて、製薬上許容される賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤などの医薬組成物として調製することができ、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。又、本発明のオリゴRNAを発現するベクターを投与することも可能である。

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸の投与経路は特に限定するものではないが、好ましくは患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高める封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.001~100mg/kg、好ましくは0.1~10mg/kgの範囲で投与することができるが、特に限定するものではない。

本発明は更に、上記本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸をHCVのRNAに結合させて、HCVの複製能を阻害する方法を提供する。本発明の方法は、in vivo 及び in vitro の双方でHCVを含むか、または含むおそれのあるサンプルと本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸とを接触させることを含む。HCVの複製能の阻害の有無は、当分野で通常用いられる方法によって検出することができる。

以下、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定

されるものではない。

実施例 1 siRNA の標的とする領域の決定

C 型肝炎ウイルスの多くの分離株の中で遺伝子を構成している塩基配列、特に 5' 側の非翻訳領域からコア領域および 3' 側の非翻訳領域において相同性が高い領域を見出すために、配列の比較を行った。

図 3 に HCV の分離株である HCV-1 (GenBank Accession no. M62321)、HCV-BK (Accession no. M58335)、HCV-J (Accession no. D90208)、R6 (Accession no. AY045702)、R24、S14J、HCJ6、JFH1 (Accession no. AB047639)、JCH1 (Accession no. AB047640)、JCH3 (Accession no. AB047642)、HCJ8 (Accession no. D10988) の RNA の 5' 側の非翻訳領域からコア領域の 500 塩基についての cDNA 配列を示す。これらの塩基配列について、当分野において通常行われる方法を用いてマルチプルアライメントを行った。結果を図 4 に示す。また、HCV の 5' 側の少なくとも 10 種の型の HCV において同一性が 95% 以上である領域から、この領域を標的として配列特異的に結合し得る siRNA を設計した。

同様に、図 5 に示した pH77J6S (Accession no. AF177039)、R6、R24L、R24S、HCJ6CH (Accession no. AF177036)、JFH1、JCH1、2b_AB030907 (Accession no. AB030907) の配列から、同様に 3' 側の非翻訳領域についてマルチプルアライメントを実施し、少なくとも 8 種の型の HCV において同一性が 95% 以上である領域から、この領域を標的として配列特異的に結合し得る siRNA を設計した。

尚、siRNA は、上記配列同一性を考慮して設計する他、翻訳開始部位直前で設計することが好ましい。更に、標的となる HCV RNA の二次構造をも考慮して設計することが好ましい。特に、5' 及び 3' UTR のループ構造及びその近傍を標的とすることができる。

実施例 2 siRNA 合成

実施例 1 の結果に基づいて、目的の HCV 全ゲノムに対して 21nt の長さで siRNA の配列を設計し、Silencer siRNA Construction Kit (Ambion cat. no. 1620) のプロトコールに従い、3' 末端に T7 プロモーター配列を含むオリゴヌクレオチドを合成した。鋳型となる各オリゴヌクレオチドを 100 μ M に調製後、T7 プライマーとハイブリダイズさせ、その後 Klenow 酵素にて 2 本鎖 DNA として T7 プロモ-

ターを用いて転写させた。合成された RNA を各々の相補鎖とアニーリングさせて 2 本鎖 RNA とした後、残存する 1 本鎖の突出末端を RNase により切断し、siRNA を作成した。最終的に合成された 15~30 μ g/reaction の siRNA を RNase free の水にて 10 μ M に調製し、12% アクリルアミドゲル電気泳動にて 20~22 塩基の二本鎖 RNA を確認後、使用時まで -80°C に保存した。

合成した siRNA 配列を以下に示す。尚、これらの配列が対応する HCV (R6 株) の配列 (Accession no. AY045702、配列番号 56) 中のヌクレオチド番号を併せて示す。

1) 5'-UTR を標的とする siRNA

R1-siRNA; 5'-GGAACUACUGUCUUCACGCAG-3' (21 塩基) (配列番号 20、53-73nt)
 R2-siRNA; 5'-GCCAUAGUGGUCUGCGGAACC-3' (21 塩基) (配列番号 21、139-159nt)
 R3-siRNA; 5'-AGGCCUUGUGGUACUGCCUGAU-3' (22 塩基) (配列番号 22、278-299nt)
 R5-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCA-3' (20 塩基) (配列番号 23、325-344nt)
 R6-siRNA; 5'-GCGAAAGGCCTTGTGGTACTG-3' (21 塩基) (配列番号 24、273-293nt)
 R7-siRNA; 5'-GTCTCGTAGACCGTGCACCA-3' (20 塩基) (配列番号 25、325-344nt)
 R5L-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCAT-3' (21 塩基) (配列番号 26、325-345nt)
 R1mut-siRNA; 5'-GGAACUACUGUCUUCACGCAG-3' (21 塩基) (配列番号 27、53-73nt)
 R2mut-siRNA; 5'-GCCAUAGUGGUCUGCGGAACC-3' (21 塩基) (配列番号 28、139-159nt)
 R3mut-siRNA; 5'-AGGCCUUGUGGUACUGCCUGAU-3' (22 塩基) (配列番号 29、278-299nt)
 R5mut-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCA-3' (20 塩基) (配列番号 30、325-344nt)
 R6mut-siRNA; 5'-GCGAAAGGCCTTGTGGTACTG-3' (21 塩基) (配列番号 31、273-293nt)
 R7mut-siRNA; 5'-GTCTCGTAGACCGTGCACCA-3' (20 塩基) (配列番号 32、325-344nt)

2) 3'-UTR を標的とする siRNA

R8-siRNA; 5'-GGCTCCATCTTAGCCCTAGTC-3' (21 塩基) (配列番号 33、9515-9535nt)
 R9-siRNA; 5'-GGCTAGCTGTGAAAGGTCCGT-3' (21 塩基) (配列番号 34、9538-9558nt)

実施例 3 HCV のコアタンパク質の発現に対する効果

本発明者等はこれまでに Cre/loxP システムにより HCV 全ゲノムをスイッチング発現する系を確立しており (J. Biol. Chem. 273, 9001-6 . (1998))、今回 Cre recombinase により HCV 全ゲノム (Genotype 1b, nucleotide no. 1~9611nt) を持続発現するヒト由来肝細胞株 Rz-HepM6 を構築し、これを標的とした。Rz-HepM6 細胞を 10% ウシ胎児血清 (REHATUIN cat. no. 1020-90) を含む Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (NISSUI cat. no. 05915) に懸濁し、24 穴プレートに 1 ウェルあたり 10^5 個の細胞で蒔き、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で一夜培養した。細胞密度が 50~70% のときに siRNA の導入を行なった。すなわち、 $2.0 \mu\text{l}$ の Oligofectamine トランスフェクション試薬 (Invitrogen cat. No. 12252-011) と $5.5 \mu\text{l}$ の Opti-MEM 1 (Gibco cat. No. 22600) を加えよく攪拌し、室温にて 10 分間放置した。その後、 $5.0 \mu\text{l}$ の合成した $10 \mu\text{M}$ siRNA を Opti-MEM 1 $40 \mu\text{l}$ に希釈し、最終 200nM になるように加えた。室温にて 20 分間放置した後、あらかじめ培養液を $200 \mu\text{l}$ の Opti-MEM 1 に交換した細胞に、Oligofectamine 試薬を加えた siRNA を直接加え 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。

siRNA 添加 4 時間後、3 倍濃度にあたる 30% のウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM $125 \mu\text{l}$ を加え 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養する。血清添加 24 時間後、細胞を lysis Buffer (1% SDS, 0.5% NP40, 0.15M NaCl, 0.5MmEDTA, 1mM DTT, 10mM Tris:pH7.4) $20 \mu\text{l}$ にて回収し、HCV コア定量キット (国際試薬 cat. No. 14861) を用いて HCV コアタンパク質を定量した。

図 6 に、siRNA 添加と Rz-HepM6 細胞株が産生する HCV コアタンパク量との関係を示す。 $200 \mu\text{M}$ の各 siRNA (R1-siRNA、R2-siRNA、R3-siRNA、R5-siRNA、R1mut-siRNA、R2mut-siRNA、R3mut-siRNA、及び R5mut-siRNA) を添加後、ウイルス粒子を構成するコアタンパク質を ELISA 法で定量した。添加した全ての siRNA はコアタンパク質の合成を阻害したが、特に R3、R5 はその作用が強く、また塩基配列の特異性も高いことが観察された。また、これらの変異導入配列である R3mut と R5mut はコアタンパク質の発現抑制効果が減弱された。

実施例 4 レプリコンアッセイ

HCV-RNA のコピー数を定量するために HCV-RNA の中にレポーター遺伝子としてホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を導入したものを構築した。Krieger ら (J.

Virol. 75, 4614-24 (2001)) の方法に従い、HCV 遺伝子の Internal Ribosome Entry Site(IRES)の直下にネオマイシン耐性遺伝子と融合する形でルシフェラーゼ遺伝子を導入した。In vitro で当該 RNA を合成後、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞 (Japanese Collection of Research Bioresources) に導入し G418 耐性クローンとして単離した。ホタル・ルシフェラーゼ HCV レプリコン細胞 (Huh-3-1) を 5 %ウシ胎児血清 (Hyclone cat. no. SH30071.03) を含むダルベッコ MEM (Gibco cat. no. 10569) に懸濁し 96 穴プレートに 5000 細胞/Well で蒔き、5 %CO₂, 37℃で一夜培養した。約 20 時間後、希釈した siRNA を Well あたり 10 μ l 加え、さらに 3 日間培養した。アッセイプレートは 2 系統用意し、1 つは白色プレート、他はクリアプレートでアッセイを行った。

培養終了後、白色プレートは Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega cat. no. E2520) に用いた。すなわち、Well あたり 100 μ l の試薬を入れ、3~4 回ピペットで混ぜ、5 分間放置後に 1450 MicroBeta TRILUX (WALLAC) にてルミネッセンスを測定した。

合成した siRNA は以下の方法で HCV レプリコン細胞に導入した。すなわち、96 穴プレートに細胞を、1 ウェルあたり 10000 個蒔き、37℃、5 %CO₂ で一夜培養した。細胞密度が 50~70%のときに siRNA の導入を行なった。すなわち、1.5 μ l の TransIT-TKO トランスフェクション試薬 (Mirus Corporation cat. No. MIR2150) と 25 μ l の Opti-MEM 1 (cata no. 31985) を激しく攪拌後、20 分間静置し、0.125 ~1.25 μ l の siRNA を混ぜ、緩やかに攪拌後さらに 20 分間静置した。この溶液を 96 穴プレート中の 100 μ l の細胞に静かに加え、緩やかに攪拌後 37℃、5 %CO₂ で一夜培養した。この細胞を用いてレプリコンアッセイを行なった。siRNA を終濃度 1nM, 10nM, 30nM, 100nM になるように加え、TransIT-TKO トランスフェクション試薬にて導入後 24 時間後に HCV レプリコン活性をレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ活性)を指標に測定した。細胞未添加の値をバックグラウンドとして全ての値から差し引き、siRNA 未添加の活性を 100%として、各 siRNA の活性を算出した。

図 7 に siRNA 添加と HCV レプリコンが複製する活性との関係を示す。配列 R3, R5, R6, R7 は容量依存的にレプリコンの活性を阻害した。また、これらの塩基配列の

一部置換体である配列 R3mut, R5mut, R6mut, R7mut はその効果が減弱されたため、配列 R3, R5, R6, R7 は塩基配列特異的な抗ウイルス作用を示すと考えられる。

実施例 5 RNA トランスフェクション効率の算定

Silencer siRNA Labeling Kit (Ambion cat no.1632) を用いてプロトコールに従って Cy3 で siRNA を標識した。すなわち、R7-siRNA 10 μ M (19.2 μ l) に 7.5 μ l の Cy3 ラベリング試薬を加え、50 μ l 中で 37°C、1 時間遮光した状態で標識を行なった。5 μ l の 5 M NaCl と 2.5 倍量の 99.5% エタノールを加えて -20°C でエタノール沈殿を行なった。4°C、15000 回転/分の遠心で Cy3 標識の siRNA を回収した。標識された siRNA の定量は Cy3 の吸収極大と分子吸光係数から算定した (http://www.ambion.com/techlib/append/base_dye.html)。

得られた Cy3 標識 siRNA を TransIT-TK0 トランスフェクション試薬を用いて細胞に導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡にて観察した。初めに位相差顕微鏡の視野で細胞の位置を確認した後、蛍光顕微鏡で Cy3 染色された細胞を観察した。このとき用いた波長は励起波長 510nm、吸収波長 550nm であった。Cy3 で標識された細胞は全体の約 90% であり、非常に高いトランスフェクション効率であることが明らかとなった。

実施例 6 ダイサーによる si-RNA の調製

HCV R6 遺伝子 (Accession no. AY045702、配列番号 56) を鋳型とし、表 1 及び 2 に示す各組み合わせのプライマーを用いて定法により PCR 反応を行った。プライマーは、複数種の HCV 間でホモロジーのある領域、あるいは HCV の複製機能に重要な領域を選んで設計した。得られた PCR 産物をゲルから切り出して精製した後、T7 RNA ポリメラーゼ (例えば、MEGAscript T7, Ambion Inc. cat # 1334) を用いて転写反応 (20 μ l vol x 4 時間) を行って RNA を合成し、アガロースゲル電気泳動で目的となる大きさの二本鎖 RNA を確認した (前駆体 siRNA-1~前駆体 siRNA-9、配列番号 47~55)。次いで DNaseI を用いて 15 分間反応させた後、LiCl 沈殿し、Nuclease free Water 20 μ l に溶解し、吸光度にて RNA 量を測定した (total 約 30~60 μ g dsRNA / reaction)。

二本鎖 RNA 名	プライマー 1	プライマー 2
前駆体 siRNA-1	Ds5-41-S25	Ds5-612-R23
前駆体 siRNA-2	Ds5-41-S25	Ds5-857-R25
前駆体 siRNA-3	Ds3-8864-S25	Ds3-9537-R25
前駆体 siRNA-4	Ds3-8864-S25	Ds3-9611-R23
前駆体 siRNA-5	Ds5-41-S25	Ds5-397-R23
前駆体 siRNA-6	Ds3-9267-S23	Ds3-9611-R23
前駆体 siRNA-7	Ds5-201-S25	Ds5-397-R23
前駆体 siRNA-8	Ds5-261-S25	Ds5-360-R25
前駆体 siRNA-9	Ds5-311-S25	Ds5-360-R25

表 2

プライマー	配 列
Ds5-41-S25	ACTCCCCTGTGAGGAAGTACTGTCT (配列番号 3 5)
Ds3-8864-S25	AGGATGATTCTGATGACCCATTCT (配列番号 3 6)
Ds3-9267-S23	GCGGGGAGACATATATCACAGC (配列番号 3 7)
Ds5-201-S25	TGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGA (配列番号 3 8)
Ds5-261-S25	TAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTG (配列番号 3 9)
Ds5-311-S25	GAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGAC (配列番号 4 0)
Ds5-612-R23	CCCTCGTTGCCATAGAGGGCCA (配列番号 4 1)
Ds5-857-R25	AACCGGGCAAATTCCTGTTGCATA (配列番号 4 2)
Ds3-9537-R25	GACTAGGGCTAAGATGGAGCCACCA (配列番号 4 3)
Ds3-9611-R23	ACATGATCTGCAGAGAGGCCAGT (配列番号 4 4)
Ds5-397-R23	GCGGCGGTTGGTGTACGTTTG (配列番号 4 5)
Ds5-360-R25	TTAGGATTTGTGCTCATGATGCACG (配列番号 4 6)

次に Gene Therapy Systems. Inc. の Dicer siRNA Generation キット (Cat #

T510001)を用い、10～20 μg の各 dsRNA をキットの Dicer タンパク質 10 unit (20 μl)にて反応 (反応液量 100 μl , 16～20 時間) した。Dicer にて切断された短鎖の二本鎖 RNA 混合物 (d-siRNA) を 3 % アガロースゲル電気泳動にて確認後、キットに付属のカラムにて脱塩ならびに非切断 RNA を除去した後、最終的に 22bp の d-siRNA をアガロースゲルで確認した。吸光度にて濃度を測定して、滅菌水にて 5 μM に調整後、使用時まで -80°C で保存した。

実施例 7 siRNA のトランスフェクション (1)

実施例 6 で二本鎖の前駆体 siRNA-1～前駆体 siRNA-6 から調製した siRNA を、実施例 4 に記載した TransIT-TKO トランスフェクション試薬 (Mirus Corporation cat. No. MIR2150) を用いて 1～50 nM の濃度で実施例 4 で用いたホタル・ルシフェラーゼ HCV レプリコン細胞 (Huh-3-1) に導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、抗ウイルス活性を求めた。結果を図 8 に示す。尚、siRNA-p53 は、癌遺伝子 p53 をダイサー処理した siRNA を添加した結果を示し、対照は滅菌水を添加した結果を示す。

その結果、ダイサーで調製した siRNA は濃度依存的に HCV レプリコンの複製活性を阻害し、抗ウイルス活性を有することが示された。

実施例 8 siRNA のトランスフェクション (2)

実施例 6 で二本鎖の前駆体 siRNA-7～前駆体 siRNA-9 から調製した siRNA を、実施例 4 に記載した TransIT-TKO トランスフェクション試薬 (Mirus Corporation cat. No. MIR2150) を用いて 3 nM または 10 nM の濃度でホタル・ルシフェラーゼ HCV レプリコン細胞 (Huh-3-1) に導入し、30 時間または 54 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、抗ウイルス活性を求めた。結果を図 9 に示す。

その結果、実施例 7 と同様に、ダイサーで調製した siRNA が濃度依存的に HCV レプリコンの複製活性を阻害し、抗ウイルス活性を有することが示された。

産業上の利用の可能性

以上詳述したように、本発明によって、HCV-RNA に対して配列特異的に結合し、HCV の働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸、及びこれらを有効成分とする C 型肝炎治療剤が提供され、HCV の新規かつ確実な

治療法の提供が可能となった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. C型肝炎ウイルス（HCV）のRNAに対して配列特異的に結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
2. HCVのRNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
3. HCVのRNAの5'非翻訳領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
4. 遺伝子型の異なる複数種のHCVの遺伝子配列において、同一性の高い領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
5. 二本鎖RNAである請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
6. 鎖長が19～23bpである、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。
7. 配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。
8. 請求項7に記載のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するHCVのRNA領域、あるいは該オリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。
9. 配列番号47～55に示すヌクレオチド配列において連続する19～23塩基からなるヌクレオチド配列で示されるオリゴヌクレオチド。
10. 請求項9に記載のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するHCVのRNA領域、あるいは該オリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするHCVのRNA領域とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。
11. 請求項1～10に記載のオリゴヌクレオチドを発現するベクター。
12. 請求項1～10に記載のオリゴヌクレオチド若しくはペプチド核

酸、または請求項 11 に記載のベクターを有効成分とする C 型肝炎治療剤。

13. 請求項 1 ～ 10 に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸を HCV の RNA に結合させて、HCV の複製能を阻害する方法。

図 1

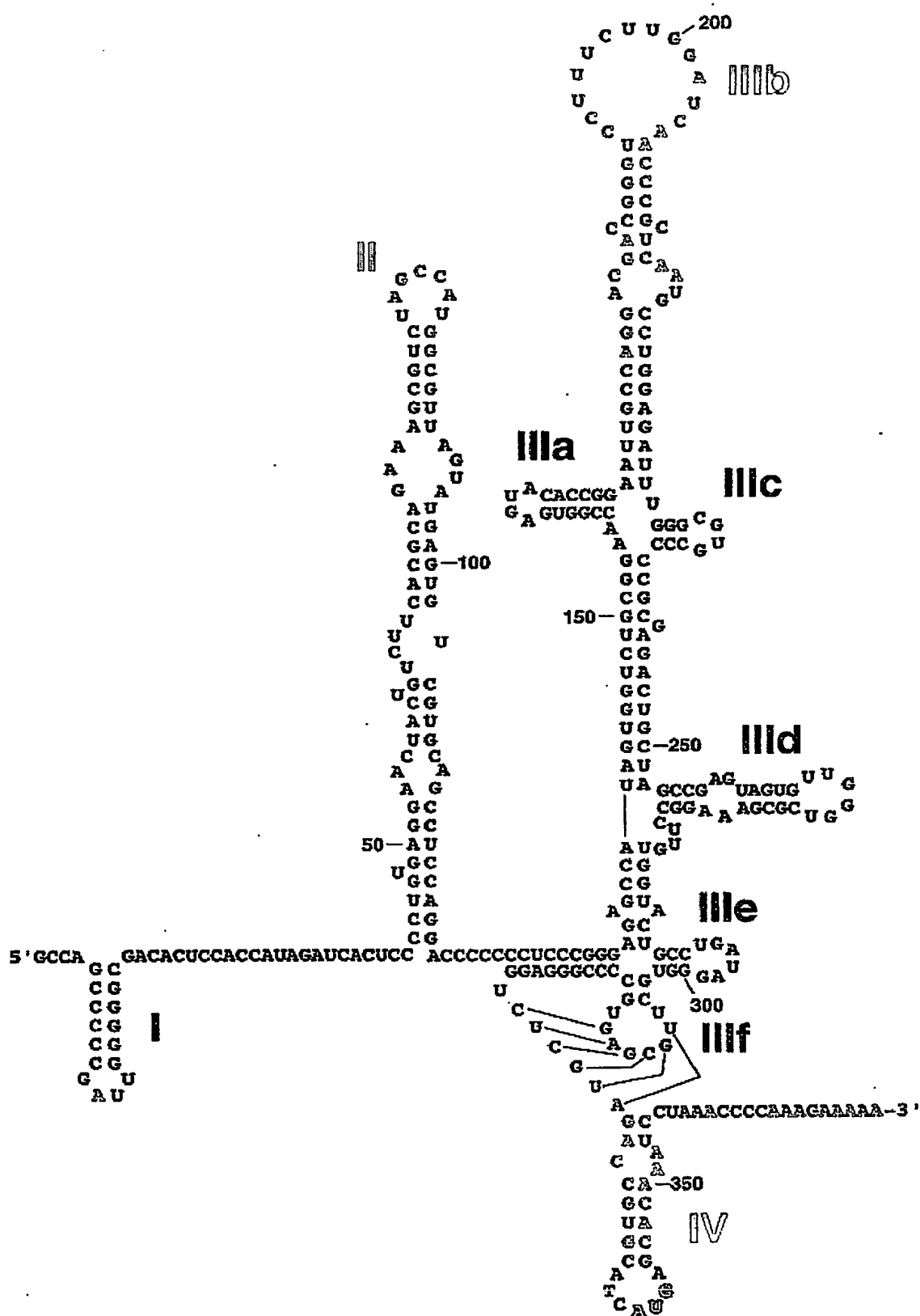


図 2

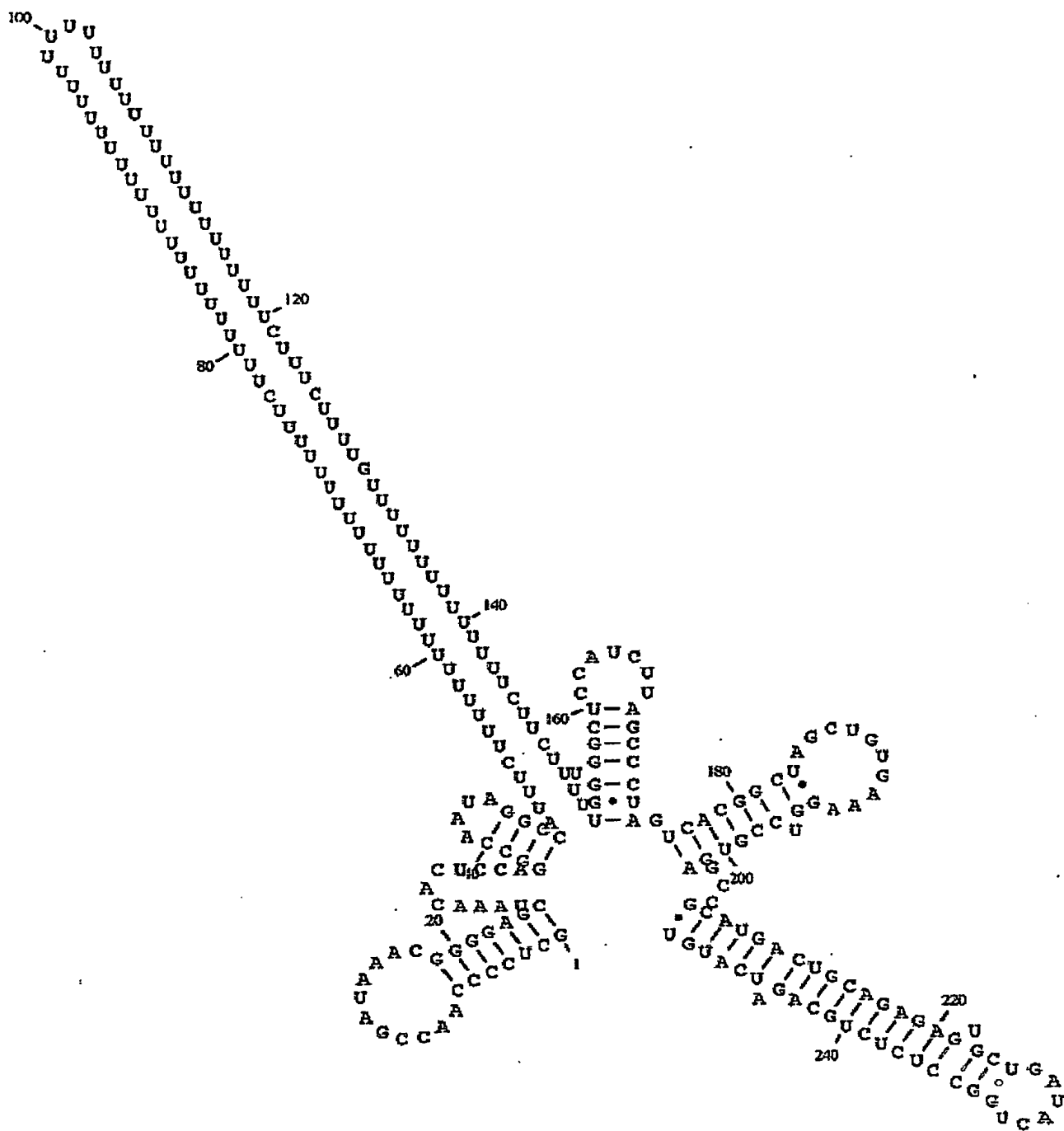


図 3 A

HCV-1

GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCG
CTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCAGC
AATCCTAAACCTCAAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTG
GCGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAG
AAAGACTTCC (配列番号 1)

HCV-BK

CGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTC
TAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCT
GCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATGCC
TGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTAC
TGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAA
CCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGA
TCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGCCAGGAAGACTTC
CGAGCGGTGCG (配列番号 2)

HCV-J

TTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
CCATGGCGTTAGTATGAGTGTTGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG
GAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATGCCTGG
AGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGC
CTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGATCATGAGCACAAATCCTAAACCT
CAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTAAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCG
TTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGA
GCGGTCGCAA (配列番号 3)

図 3 B

R6

GGGCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACG
CAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGC
CATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACC
CGCTCAATGCCTGGAGATTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGG
CCTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCA
CAAATCCCAAACCCCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG
TGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACT
AGGAAGACTT (配列番号 4)

R24

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCG
CTCTATGCCCCGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCAAAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTAAAGTTTCCGGGCG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGCGCGTAGGGGCCCCAGATTGGGTGTGCGCACAGCAAG
GAAGACTTCG (配列番号 5)

S14J

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACTGGGTCTTTCTTGATAAACCCA
CTCTATGCCCCGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCACAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTAAAGTTTCCGGGCG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCACGACAAG
GAAGACTTCG (配列番号 6)

図 3 C

HCJ6

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAACCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAAACCCAC
TCTATGCCCCGGTCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACCAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTTCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTTGCCGCGCAGGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACAAGG
AAGACTTCGG (配列番号 7)

JFH1

ACCTGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGCCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAAACCCAC
TCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGCGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACCAACCGTCGCCCAGAAGACGTTAAGTTCCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTTGCCGCGCAGGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCACGACAAGG
AAACTTCGG (配列番号 8)

JCH1

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAAACCCA
CTCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCACAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTTCCGGGCG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTTGCCGCGCAGGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCACGACAAG
GAAGACTTCG (配列番号 9)

図 3 D

JCH3

ACCCGCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAAACCCAC
TCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACCGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGACAAACCAAAAGAAACACCAGCCGTCGCCCACAAGACGTTAGGTTTCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGTCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACAAGG
AAGACTTCGG (配列番号 1 0)

HCJ8

GCCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAAACCCA
CTCTATGTCCGGTCATTTGGGCACGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAAGAAACACAAACCGCCGCCACAGGACGTTAAGTTCCCGGGTG
GCGGTCAGATCGTTGGCGGAGTTTACTTGCTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACAAG
GAAGACTTCT (配列番号 1 1)

4A

Hcv-1.nc	1	--GCCAGCCCCCTGATGGGGGGGACACCTCCACCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	58
Hcv-bk.nc	1	-----CGATGGGGGGGACACCTCCACCATAGATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	49
Hcv-j.nc	1	-----TTGGGGGGGACACCTCCACCATAGATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	46
R6.nc	1	GGGCAGCCCCCGATGGGGGGGACACCTCCACCATAGATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	60
R24.nc	1	--ACCCGCCCCCTAATAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	58
S14j.nc	1	--ACCCGCCCCCTAATAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	58
Hcj6.nc	1	ACCGGCCCTAATAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	60
Jfh1.nc	1	--ACCTGCCCTA-ATAAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	57
Jch1.nc	1	--ACCCGCCCTA-ATAAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	57
Jch3.nc	1	--ACCCGCCCTA-ATAAGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	57
Hcj8.nc	1	--GCCCGCCCCCTGATGGGGGGGACACCTCCGCCATGAATCACTCCCTGTGAGGAACCTAC	58
Hcv-1.nc	59	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	118
Hcv-bk.nc	50	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	109
Hcv-j.nc	47	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	106
R6.nc	61	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	120
R24.nc	59	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	118
S14j.nc	59	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	118
Hcj6.nc	61	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	120
Jfh1.nc	58	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	117
Jch1.nc	58	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	117
Jch3.nc	58	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	117
Hcj8.nc	59	TGTCCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTCCAGCCTCCAGG	118
Hcv-1.nc	119	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	178
Hcv-bk.nc	110	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	169
Hcv-j.nc	107	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	166
R6.nc	121	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	180
R24.nc	119	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	178
S14j.nc	119	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	178
Hcj6.nc	121	CTCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	180
Jfh1.nc	118	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	177
Jch1.nc	118	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	177
Jch3.nc	118	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	177
Hcj8.nc	119	ACCCGCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC	178

4 B

Hcv-1.nc	179	AGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	238
Hcv-bk.nc	170	AGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	229
Hcv-j.nc	167	AGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	226
R6.nc	181	AGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	240
R24.nc	179	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	238
S14j.nc	179	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	238
Hcj6.nc	181	AAGCTGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	240
Jfh1.nc	178	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	237
Jch1.nc	178	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	237
Jch3.nc	178	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	237
Hcj8.nc	179	GGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGCGTGCCCG	238
Hcv-1.nc	239	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	298
Hcv-bk.nc	230	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	289
Hcv-j.nc	227	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	286
R6.nc	241	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	300
R24.nc	239	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	298
S14j.nc	239	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	298
Hcj6.nc	241	GAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	300
Jfh1.nc	238	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	297
Jch1.nc	238	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	297
Jch3.nc	238	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	297
Hcj8.nc	239	CCGACGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATA	298
Hcv-1.nc	299	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	358
Hcv-bk.nc	290	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	349
Hcv-j.nc	287	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	346
R6.nc	301	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	360
R24.nc	299	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	358
S14j.nc	299	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	358
Hcj6.nc	301	TGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	360
Jfh1.nc	298	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	357
Jch1.nc	298	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	357
Jch3.nc	298	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	357
Hcj8.nc	299	GGGTGCTTGGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCATA	358

Hcv-1.nc	359	ACCTCAAA	AAAAA	AAACGTAACACCAACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	418
Hcv-bk.nc	350	ACCTCAAA	AAAAA	AAACGTAACACCAACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	409
Hcv-j.nc	347	ACCTCAAA	AAAAA	AAACGTAACACCAACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	406
R6.nc	361	ACCCAAAG	AAAAA	CCAAACGTAACACCAACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	420
R24.nc	359	ACCTCAAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	418
S14j.nc	359	ACCTCAAA	AAAAA	CCCAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	418
Hcj6.nc	361	TCAAAGAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	420
Jfh1.nc	358	ACCTCAAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	417
Jch1.nc	358	ACCTCAAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	417
Jch3.nc	358	ACCTCAAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	417
Hcj8.nc	359	ACCTCAAA	AAAAA	CCAAAGAAACATACCGTGGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGG	418
Hcv-1.nc	419	TGGCGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	478
Hcv-bk.nc	410	CGGTGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	469
Hcv-j.nc	407	CGGTGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	466
R6.nc	421	TGGTGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	480
R24.nc	419	CGCGGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	478
S14j.nc	419	CGCGGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	478
Hcj6.nc	421	CGGCCA	GCATCGTGG	GGAGTATATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	480
Jfh1.nc	418	CGCGGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	477
Jch1.nc	418	CGCGGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	477
Jch3.nc	418	CGCGGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	477
Hcj8.nc	419	TGGCGG	TCAGATCG	TGGTGGAGCTTATCTGTTGCCGCGAGGGGCCCTAGATTGGGTGT	478
Hcv-1.nc	479	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCC-----	500
Hcv-bk.nc	470	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCCAGCGGTCC-----	500
Hcv-j.nc	467	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCCAGCGGTCCAGCGGTCCGAA	500
R6.nc	481	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTT-----	500
R24.nc	479	GCGCA	CAAGGAA	AGACTTCC-----	500
S14j.nc	479	GCGCA	CAAGGAA	AGACTTCC-----	500
Hcj6.nc	481	CGCGCA	CAAGGAA	AGACTTCCG	500
Jfh1.nc	478	GCGCA	CAAGGAA	AGACTTCCG-----	500
Jch1.nc	478	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCCG-----	500
Jch3.nc	478	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCCG-----	500
Hcj8.nc	479	GCGCGG	CAAGGAA	AGACTTCT-----	500

図 5 A

p H77J6S

GCGTGTCTCATGCCCGGCCCCGCTGGTTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCGCTGCAGGGGTAGGCATCTA
CCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAACACTCCGGCCTCTTAAGCCATTTCTGTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTCTTTTCCCTTCTTT
AATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGA
GTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 2)

R6

GTCCAGCTGGTTCGTGGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCGC
TGGTTCATGTTGTGCCTACTCCTACTTTTCACTAGGGGTAGGCATCTACCTGCTCCCCAACCGATAAACGG
GGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTGGTGGCT
CCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATAC
TGGCCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 3)

R24L

TGGGCGGTGAAGACCAAGCTCAAACACTCACTCCATTGCCGGAAGCGCGCCTCCTGGATTTATCCAGCTGGT
TCACTGTGCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGCCGCGTGCCCGACCCCGCTTATTACTCCT
TGGCCTACTCCTACTTTTTGTAGGGGTAGGCCTTTTCTACTCCCCGCTCGGTAGAGCGGCACACATTAG
CTACACTCCATAGCTAACTGTCCCTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTGTTTCTTTTCTTCTCATTTCCTTCTTATCTTAATTACTTCCTTTCTGCTGGTCC
ATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGATTGCCGTAACCTG
GTATCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 4)

R24S

CCTGGATTTATCCAGCTGGTTCCTACTGTGCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGCCGCGTGCC
CGACCCCGCTTATTACTCCTTGGCCTACTCCTACTTTTTGTAGGGGTAGGCCTTTTCTACTCCCCGCTC
GGTAGAGCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTCTTTT
CCTTCTCATTTCTTCTTATCTTAATTACTTTCTTTCTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTA
GCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGATTGCCGTAACCTGGTATCTCTGCAGATCATGT (配
列番号 1 5)

図 5 B

HCJ6CH

TTTATCCAGTTGGTTTACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGTGCGGTGCCCCGACCC
CGCTTATTACTCCTTAGCCTACTCCTACTTTTCGTAGGGGTAGGCCTCTTTTACTCCCCGCTCGGTAGA
GCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCCTTCTCCTTCTCACCTTCTTTACTTCT
TTCCTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGA
GAGTGCCGTA (配列番号 1 6)

JFH1

GGACTTATCCAGTTGGTTCACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTTTCACAGCGTGTGCGCGCCCCGA
CCCCGCTCATTACTCTTCGGCCTACTCCTACTTTTCGTAGGGGTAGGCCTCTTCCTACTCCCCGCTCGGT
AGAGCGGCACACACTAGGTACACTCCATAGCTAACTGTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCCCTTCTCATCTTATTCTACTTCTTTCTT
GGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTG
CCGTAAGTGGTCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 7)

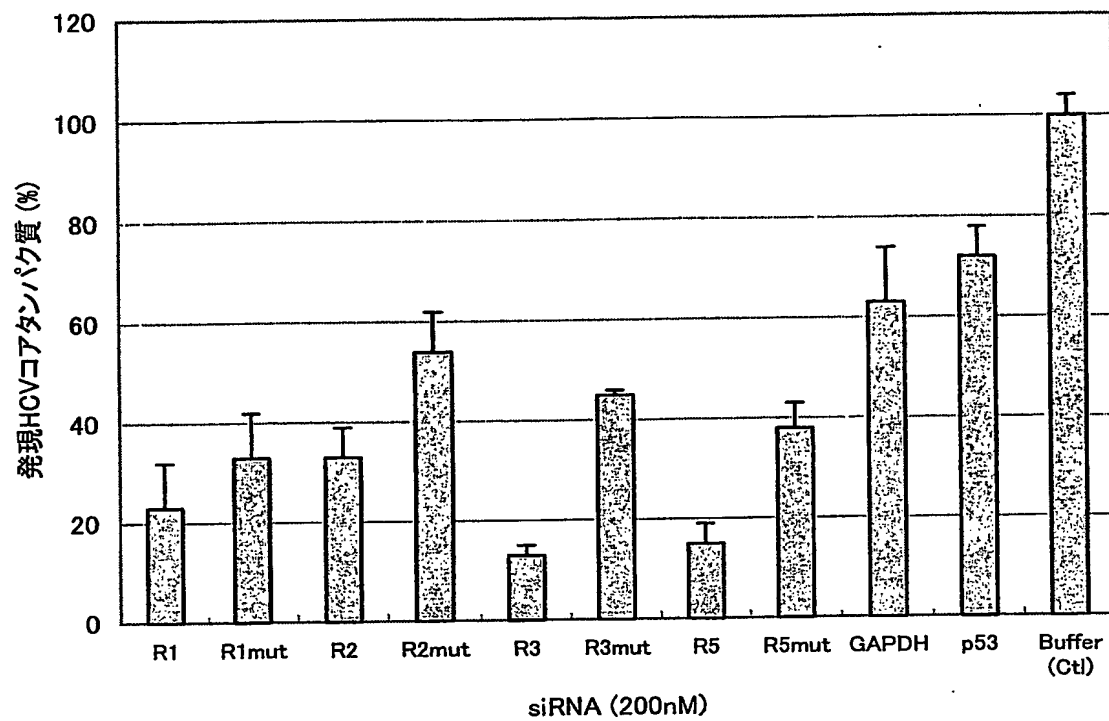
JCH1

GGATTTGTCCAGTTGGTTTACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGTGCGGTGCCCCGA
CCCCGCTATTACTCCTTAGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCCTCTTCCTACTCCCCGCTCGAT
AGAGCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCCCTTCTCATCTTATTCTACTTCTTTCTTGGTG
GCTCCATCTTAGCCCTGGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCCGT
AACTGGTCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 8)

2b_AB030907

TAGATTTATCCGGTGGTTCACCGTGGGCGCCGGCGGGGGCGACATCTTTCACAGCGTGTGCGATGCCCCG
ACCCCGCCTATTACTCCTTTGCCTACTCCTACTTAGCGTAGGAGTAGGCATCTTTTACTCCCCGCTCGG
TAGAGCGGCAAACCTAGCTACACTCCATAGCTAGTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTCTCTTTTTTCCGTATTTTTTTTTTTTTTCTCTTTCTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTC
ACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCCGTAAGTGGTCTCTCTGCAGATC
ATGT (配列番号 1 9)

図 6



7

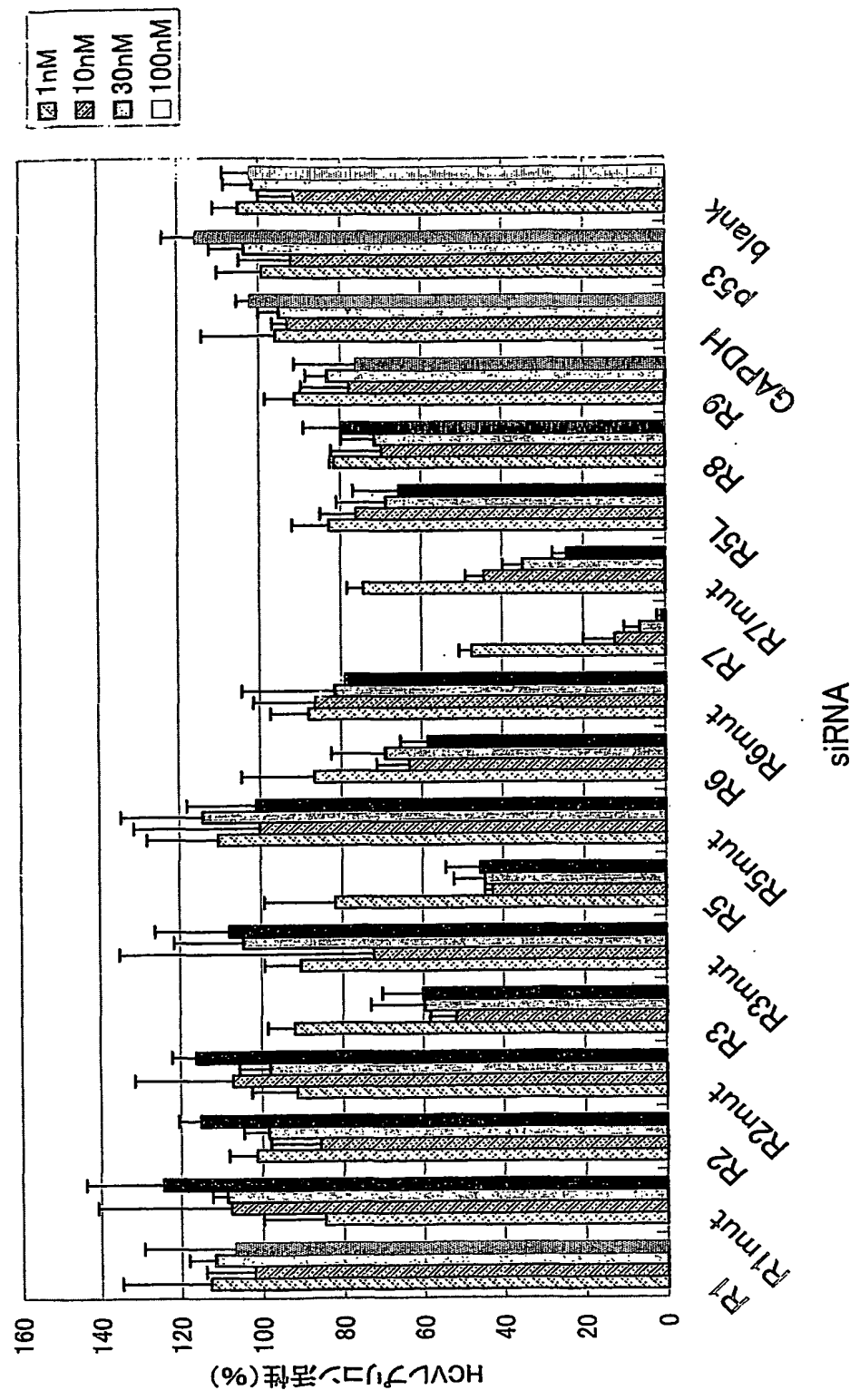


図 8

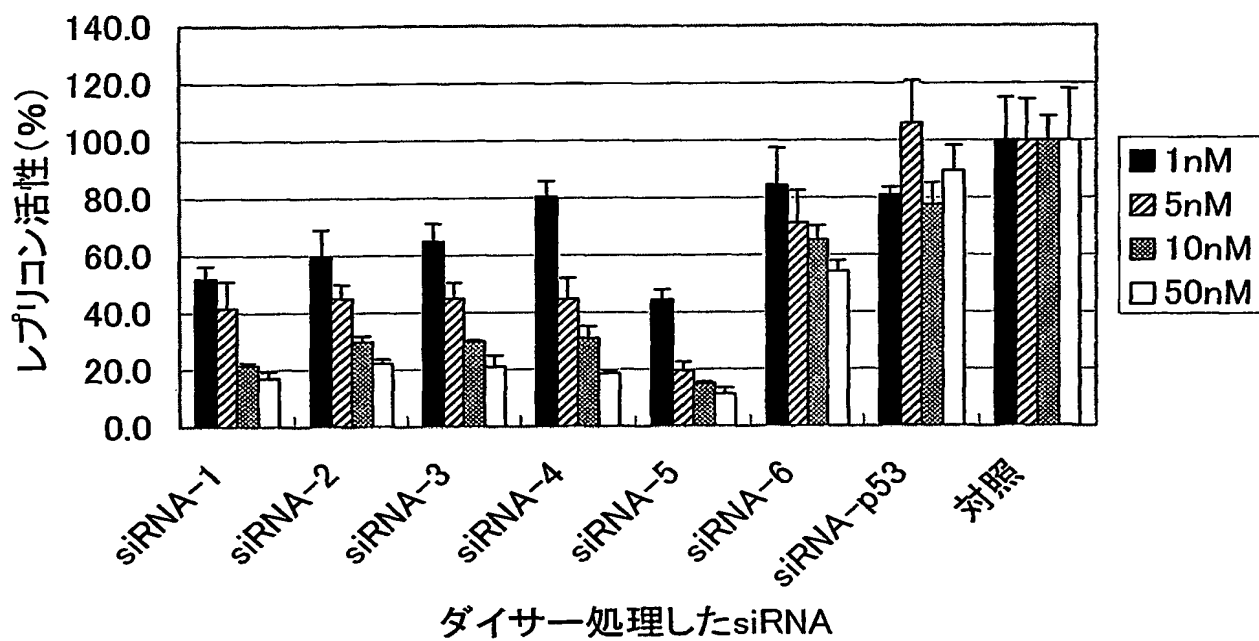
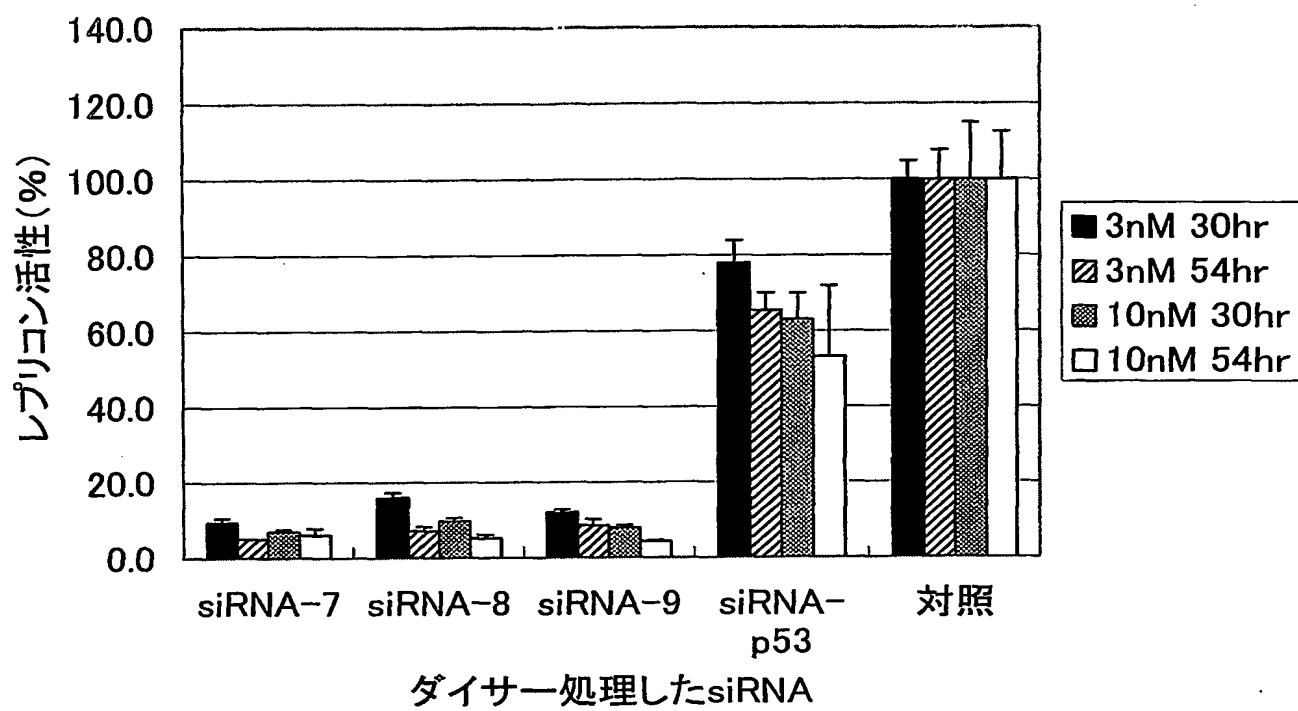


図 9



SEQUENCE LISTING

<110> TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> An Oligoribonucleotide and an Peptide Nucleic Acid Inhibiting the
Action of Hepatitis C Virus

<130> PH-1994-PCT

<150> JP 2003/016750

<151> 2003-01-24

<160> 56

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360

ctcaaaaaaa aaacaaacgt aacaccaacc gtcgcccaca ggacgtcaag ttcccgggtg 420
gcggtcagat cgttggtgga gtttacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcgcgcacgag aaagacttcc 500

<210> 2

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

cgattggggg cgacactcca ccatagatca ctcccctgtg aggaactact gtcttcacgc 60
agaaagcgtc tagccatggc gttagtatga gtgtcgtgca gcctccagga cccccctcc 120
cgggagagcc atagtgtgtc gcggaaccgg tgagtacacc ggaattgcca ggacgaccgg 180
gtcctttctt ggatcaaccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc cgcgagactg 240
ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc cttgtggtac tgcctgatag ggtgcttgcg 300
agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca ccatgagcac gaatcctaaa cctcaaagaa 360
aaaccaaacg taacaccaac cgccgcccac aggacgtcaa gttcccgggc ggtggtcaga 420
tcgttggtgg agtttacctg ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgccca 480
ggaagacttc cgagcggtcg 500

<210> 3

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

ttgggggcga cactccacca tagatcactc ccctgtgagg aactactgtc ttcacgcaga 60

aagcgtctag ccattggcgtt agtatgagtg ttgtgcagcc tccaggaccc cccctcccgg 120
gagagccata gtggtctgcg gaaccggtga gtacaccgga attgccagga cgaccgggtc 180
ctttcttggg tcaaccgct caatgcctgg agatttgggc gtgccccgc gagactgcta 240
gccgagtagt gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtactgc ctgatagggt gcttgcgagt 300
gccccgggag gtctcgtaga ccgtgcatca tgagcacaaa tcctaaacct caaagaaaaa 360
ccaaacgtaa caccaaccgc cgccacagg acgttaagtt cccgggcggt ggtcagatcg 420
ttggtggagt ttacctgttg ccgcgcaggg gccccagggt gggtgtgctc gcgactagga 480
agacttccga gcggtcgcaa 500

<210> 4

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 4

gggccagccc ccgattgggg gcgacactcc accatagatc actcccctgt gaggaactac 60
tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgttagtatg agtgtcgtgc agcctccagg 120
acccccctc ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtgagtacac cggaattgcc 180
aggacgaccg ggtcctttct tggatcaacc cgctcaatgc ctggagattt gggcgtgccc 240
ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg ccttgtggta ctgcctgata 300
gggtgcttgc gagggtcccc ggaggtctcg tagaccgtgc atcatgagca caaatcccaa 360
accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgtcgccca caggacgtca agttcccggg 420
tggtggtcag atcgttggtg gaggttacct gttgccgcgc aggggccccca ggttgggtgt 480
gcgcgcgact aggaagactt 500

<210> 5

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 5

```
accgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagaccggg tcctttcttg gataaaccgc ctctatgccc ggccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccacaaaga aacactaacc gtcgccca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgttggcgga gtatacttgt tgccgcgtag gggccccaga ttgggtgtgc 480
gcacagcaag gaagacttcg 500
```

<210> 6

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 6

```
accgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagactggg tcctttcttg gataaaccga ctctatgccc ggccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccacacaga aacactaacc gtcgccca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgttggcgga gtatacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
```


gcacgacaag gaagacttcg

500

<210> 7

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 7

acccgcccct aataggggcg acactccgcc atgaaccact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gtcatttggg cgtgcccccg 240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg 300
tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420
cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
cgcgacaagg aagacttcgg 500

<210> 8

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 8

acctgcccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180

aagactgggt cctttcttgg ataaacccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttggtactg cctgataggg 300
cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccagaa gacgttaagt tcccgggcgg 420
cggccagatc gttggcgagg tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
cacgacaagg aaaacttcgg 500

<210> 9

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 9

accgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagactggg tcctttcttg gataaaccca ctctatgcc gccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgttggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccacaga aacactaacc gtcgccaca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgttggcgga gtatacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcacgacaag gaagacttcg 500

<210> 10

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 10

accgcgccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
caagaccgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagacaa accaaaagaa acaccagccg tcgcccacaa gacgttaggt ttccgggcgg 420
cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
cgcgacaagg aagacttcgg 500

<210> 11

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 11

gcccccccc tgatgggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattaccgg 180
aaagactggg tcctttcttg gataaaccca ctctatgtcc ggtcatttgg gcacgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgttgtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcat catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aacaaaaga aacacaaacc gccgccaca ggacgttaag ttccccgggtg 420
gcggtcagat cgttggcgga gtttacttgc tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgacaag gaagacttct 500

<210> 12

<211> 311

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 12

```
gcgtgtctca tgcccggccc cgctggttct ggttttgcct actcctgctc gctgcagggg 60
taggcatacta cctcctcccc aaccgatgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc 120
catttcctgt tttttttttt tttttttttt tttttttctt tttttttttc tttcctttcc 180
ttcttttttt cctttctttt tcccttcttt aatggtggct ccatcttagc cctagtcacg 240
gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcatg actgcagaga gtgctgatac tggcctctct 300
gcagatcatg t                                     311
```

<210> 13

<211> 371

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 13

```
gtccagctgg ttcgtggctg gttacagcgg gggagacata tatcacagcc tgtctcgtgc 60
ccgaccccg c tggttcatgt tgtgcctact cctactttca gtaggggtag gcatctacct 120
gctccccaac cgataaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat ttcttttttt 180
tttttttttt ttttttcttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 240
ctttcttttg tttttttttt ttttcttctt tttggtggct ccatcttagc cctagtcacg 300
gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcatg actgcagaga gtgctgatac tggcctctct 360
gcagatcatg t                                     371
```

<210> 14

<211> 439

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 14

```

tgggcggtga agaccaagct caaactcact ccattgccgg aagcgcgcct cctggattta 60
tccagctggg tcaactgtcg cgccggcggg ggcgacattt atcacagcgt gccgcgtgcc 120
cgaccccgct tattactcct tggcctactc ctactttttg taggggtagg ccttttccta 180
ctccccgctc ggtagagcgg cacacattag ctacactcca tagctaactg tccctttttt 240
tttgtttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttt tttgtttctt 300
ttcctttctc tttccttctt atcttaatta ctccctttcc tgggtggctcc atcttagccc 360
tagtcacggc tagctgtgaa aggtccgtga gccgcatgac tgcagagatt gccgtaactg 420
gtatctctgc agatcatgt                                     439

```

<210> 15

<211> 347

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 15

```

cctggattta tccagctggg tcaactgtcg cgccggcggg ggcgacattt atcacagcgt 60
gccgcgtgcc cgaccccgct tattactcct tggcctactc ctactttttg taggggtagg 120
ccttttccta ctccccgctc ggtagagcgg cacacattag ctacactcca tagctaactg 180
tccctttttt tttttttttt tgtttctttt cctttctatt tccttcttat cttaattact 240
ttctttcctg gtggctccat cttagcccta gtcacggcta gctgtgaaag gtccgtgagc 300
cgcatgactg cagagattgc cgtaactggg atctctgcag atcatgt . 347

```

<210> 16

<211> 360

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 16

```
tttatccagt tggtttacg tcggcgccgg cgggggcgac atttatcaca gcgtgtcgcg 60
tgcccgaccc cgcttattac tccttagcct actcctactt ttcgtagggg taggcctctt 120
tttactcccc gctcggtaga gcggcacaca ttagctacac tccatagcta actgttcctt 180
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 240
ttttttttct ttccttcctt tctcaccttc ttttacttct ttcttggtgg ctccatctta 300
gccctagtca cggctagctg tgaaaggtcc gtgagccgca tgactgcaga gagtgccgta 360
```

<210> 17

<211> 378

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 17

```
ggacttatcc agttggttca ccgtcggcgc cggcgggggc gacatttttc acagcgtgtc 60
gcgcgcccga ccccgctcat tactcttcgg cctactccta cttttcgtag gggtaggcct 120
cttcctactc cccgctcggg agagcggcac aactaggta cactccatag ctaactgttc 180
cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttt 240
cctctttctt cccttctcat cttattctac tttctttctt ggtggctcca tcttagccct 300
agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg ccgtaactgg 360
tctctctgca gatcatgt
```

378

<210> 18

<211> 374

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 18

```
ggatttgtcc agttggttta ccgtcggcgc cggcgggggc gacatttata acagcgtgtc 60
gcgtgcccga ccccgccctat tactccttag cctactccta ctttctgtag gggtaggcct 120
cttcctactc cccgctcgat agagcggcac acattagcta cactccatag ctaactgttc 180
cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttc tttttttttt tttttccctc 240
tttcttccct tctcatctta ttctactttc tttcttggtg gctccatctt agccctggtc 300
acggctagct gtgaaaggtc cgtgagccgc atgactgcag agagtgccgt aactggtctc 360
tctgcagatc atgt 374
```

<210> 19

<211> 354

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 19

```
tagatttata cgggtggttc accgtgggcg ccggcggggg cgacatcttt cacagcgtgt 60
cgcatgcccg acccgccta ttactccttt gcctactcct acttagcgta ggagtaggca 120
tctttttact cccgctcgg tagagcggca aaccctagct aactccata gctagttttc 180
tttttttttt tttttttttt ttttgttttt tttttttttc ctctttttcc gtattttttt 240
tttttctctt tttcttggtg gctccatctt agccctagtc acggctagct gtgaaaggtc 300
cgtgagccgc atgactgcag agagtgccgt aactggtctc tctgcagatc atgt 354
```

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 20

ggaacuacug ucuucacgca g

21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 21

gccauagugg ucugcggaac c

21

<210> 22

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 22

aggccuugug guacugccug au

22

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 23

gucucguaga ccgugcauca

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 24

gcgaaaggcc ttgtggtact g

21

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 25

gtctcgtaga ccgtgcacca

20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 26

gucucguaga ccgugcauca t

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 27

ggaacuacug ucuucacgca g

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 28

gccauagugg ucugcggaac c

21

<210> 29

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 29

aggccuugug guacugccug au

22

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 30

gucucguaga ccgugcauca

20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 31

gcgaaaggcc ttgtgtact g

21

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 32

gtctcgtaga ccgtgcacca

20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-UTR target siRNA

<400> 33

ggctccatct tagccctagt c

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-UTR target siRNA

<400> 34

ggctagctgt gaaaggtccg t

21

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-41-S25

<400> 35

actccctgt gaggaactac tgtct

25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds3-8864-S25

<400> 36

aggatgattc tgatgaccca tttct

25

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds3-9267-S23

<400> 37

gcgggggaga catatatcac agc

23

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-201-S25

<400> 38

tggatcaacc cgctcaatgc ctgga

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-261-S25

<400> 39

tagtggtggg tcgcgaaagg ccttg

25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-311-S25

<400> 40

gagtgccccg ggaggtctcg tagac

25

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-612-R23

<400> 41

ccctcgttgc catagagggg cca

23

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-857-R25

<400> 42

aaccgggcaa attccctggt gcata

25

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds3-9537-R25

<400> 43

gactagggct aagatggagc cacca

25

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds3-9611-R23

<400> 44

acatgatctg cagagaggcc agt

23

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-397-R23

<400> 45

gcggcggttg gtgttacgtt tgg

23

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

Ds5-360-R25

<400> 46

ttaggatttg tgctcatgat gcacg

25

<210> 47

<211> 572

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product

siRNA-1

<400> 47

actccccctgt gaggaactac tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgtagtatg 60
agtgtcgtgc agcctccagg accccccctc ccgggagagc catagtgggc tgcggaaccg 120
gtgagtacac cggaattgcc aggacgaccg ggtcctttct tggatcaacc cgctcaatgc 180
ctggagattt gggcgtgccc ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg 240
ccttgtggta ctgcctgata gggtgcttgc gagtgccccg ggaggtctcg tagaccgtgc 300
atcatgagca caaatcctaa accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgccgccca 360
caggacgtca agttcccggg tggtggtcag atcgttgggt gagtttacct gttgccgcgc 420
aggggccccca ggttgggtgt gcgcgcgact aggaagactt ccgagcggtc acaacctcgt 480
ggaaggcgac aacctatccc caaggctcgc cagcccaggg gcagggcctg ggctcagccc 540
gggtaccctt ggcccctcta tggcaacgag gg 572

<210> 48

<211> 817

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product

siRNA-2

<400> 48

actccccctgt gaggaactac tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgtagtatg 60
agtgtcgtgc agcctccagg accccccctc ccgggagagc catagtgggc tgcggaaccg 120
gtgagtacac cggaattgcc aggacgaccg ggtcctttct tggatcaacc cgctcaatgc 180
ctggagattt gggcgtgccc ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg 240
ccttgtggta ctgcctgata gggtgcttgc gagtgccccg ggaggtctcg tagaccgtgc 300
atcatgagca caaatcctaa accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgccgccca 360
caggacgtca agttcccggg tggtggtcag atcgttgggt gagtttacct gttgccgcgc 420

aggggccccca ggttgggtgt gcgcgcgact aggaagactt ccgagcggtc acaacctcgt 480
ggaaggcgac aacctatccc caaggctcgc cagcccagg gcagggcctg ggctcagccc 540
gggtaccctt ggccccctcta tggcaacgag ggcatggggt gggcaggatg gctcctgtca 600
ccccgcggct cccggcctag ttggggcccc acggaccccc ggcgtaggtc gcgtaatttg 660
ggtaaggtca tcgataccct cacatgcggc ttgcgcgacc tcatggggta cattccgctc 720
gtcggcgccc ccctaggggg cgttgccagg gccctggcac atggtgtccg ggttgtggag 780
gacggcgtga actatgcaac agggaatttg cccggtt 817

<210> 49

<211> 674

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product

siRNA-3

<400> 49

aggatgattc tgatgacca tttcttctcc atccttctag ccaggagca acttgaaaaa 60
gccctggatt gccagatcta cggggcctgt tactccattg agccacttga cctacctcag 120
atcattgaac gactccatgg tcttagcgca ttttcaactcc atagttactc tccagggtgag 180
atcaataggg tggcttcatg cctcaggaaa cttgggggtac cacccttgcg agtctggaga 240
catcgggcca gaagtgtccg cgctaagctg ctgtcccagg gggggagggc tgccacttgt 300
ggtaagtacc tcttcaactg ggcagtaagg accaagctca aactcaactcc aatcccggca 360
gcgtcccagt tggacttgct cagctgggtc gtggctgggt acagcggggg agacatatat 420
cacagcctgt ctogtgcccg accccgctgg ttcattgtgt gcctactcct actttcagta 480
ggggtaggca tctacctgct cccaaccga taaacgggga gctaaacact ccaggccaat 540
aggccatttc tttttttttt tttttttttt tttctttttt tttttttttt tttttttttt 600

tttttttttt tttttttctt tcttttggtt tttttttttt tcttcttttt ggtggctcca 660
tcttagccct agtc 674

<210> 50

<211> 748

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product
siRNA-4

<400> 50

aggatgattc tgatgacca tttcttctcc atccttctag cccaggagca acttgaaaaa 60
gccctggatt gccagatcta cggggcctgt tactccattg agccacttga cctacctcag 120
atcattgaac gactccatgg tcttagcgca ttttcactcc atagttactc tccaggtgag 180
atcaataggg tggcttcatg cctcaggaaa cttgggggtac cacccttgcg agtctggaga 240
catcgggcca gaagtgtccg cgctaagctg ctgtcccagg gggggagggc tgccacttgt 300
ggtaagtacc tcttcaactg ggcagtaagg accaagctca aactcactcc aatcccggca 360
gcgtcccagt tggacttgtc cagctggttc gtggctgggt acagcggggg agacatatat 420
cacagcctgt ctcgtgcccg accccgctgg ttcattgtgt gcctactcct actttcagta 480
ggggtaggca tctacctgct cccaaccga taaacgggga gctaaacact ccaggccaat 540
aggccatttc tttttttttt tttttttttt tttctttttt tttttttttt tttttttttt 600
tttttttttt tttttttctt tcttttggtt tttttttttt tcttcttttt ggtggctcca 660
tcttagccct agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg 720
ctgatactgg cctctctgca gatcatgt 748

<210> 51

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product
siRNA-5

<400> 51

```
actccctgt gaggaactac tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgtagtatg 60
agtgtcgtgc agcctccagg acccccctc ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg 120
gtgagtacac cggaattgcc aggacgaccg ggtcctttct tggatcaacc cgctcaatgc 180
ctggagattt gggcgtgccc ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg 240
ccttgtggta ctgcctgata gggtgcttgc gagggtctcg tagaccgtgc 300
atcatgagca caaatcctaa accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgccgc 357
```

<210> 52

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product
siRNA-6

<400> 52

```
gcgggggaga catatatcac agcctgtctc gtgcccgacc ccgctggttc atgttgtgcc 60
```

tactcctact ttcagtaggg gtaggcatct acctgctccc caaccgataa acggggagct 120
aaacactcca ggccaatagg ccatttcctt tttttttttt tttttttttt cttttttttt 180
tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttctttct tttgtttttt ttttttttct 240
tcttttttggg ggctccatct tagccctagt cacggctagc tgtgaaaggt ccgtgagccg 300
catgactgca gagagtgctg atactggcct ctctgcagat catgt 345

<210> 53

<211> 197

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product

siRNA-7

<400> 53

tggatcaacc cgctcaatgc ctggagattt gggcgtgccc ccgcgagact gctagccgag 60
tagtgttggg tcgcgaaagg ctttgtggtg ctgcctgata ggggtgcttgc gagggtctcg 120
tagaccgtgc atcatgagca caaatcctaa accccaaaga aaaaccaaac 180
gtaacaccaa ccgccgc 197

<210> 54

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product
siRNA-8

<400> 54

tagtggtggg tcgcgaaagg ccttggtgta ctgcctgata gggtgcttgc gagtgccccg 60
ggaggtctcg tagaccgtgc atcatgagca caaatcctaa 100

<210> 55

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR product
siRNA-9

<400> 55

gagtgccccg ggaggtctcg tagaccgtgc atcatgagca caaatcctaa 50

<210> 56

<211> 9611

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 56

gggccagccc ccgattgggg ggcacactcc accatagatc actcccctgt gaggaactac 60
tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgtagtatg agtgtcgtgc agcctccagg 120

acccccctc ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtgagtacac cggaattgcc 180
aggacgaccg ggtcctttct tggatcaace cgctcaatgc ctggagattt gggcgtgccc 240
ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg ccttgtggta ctgcctgata 300
gggtgcttgc gagtgccccg ggaggtctcg tagaccgtgc atcatgagca caaatcctaa 360
accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgccgcca caggacgtca agttcccggg 420
tgggtggtcag atcgttgggtg gagtttacct gttgccgcgc aggggccccca ggttgggtgt 480
gcgcgcgact aggaagactt ccgagcggtc acaacctcgt ggaaggcgac aacctatccc 540
caaggctcgc cagcccaggg gcagggcctg ggctcagccc gggtagcctt ggccccctcta 600
tggcaacgag ggcattgggtt gggcaggatg gctcctgtca cccgcggct cccggcctag 660
ttggggcccc acggaccccc ggcgtaggtc gcgtaatttg ggtaaggta tcgataacct 720
cacatgcggc ttcgccgacc tcatggggta cattccgctc gtcggcgccc ccctaggggg 780
cgttgccagg gccctggcac atgggtgtccg ggttgtggag gacggcgtga actatgcaac 840
agggaatttg cccggttgct ctttctctat cttcctcttg gctctgctgt cctgtttgac 900
catcccagct tccgcttatg aggtgcgcaa cgtatccggg atataccatg tcacgaacga 960
ctgctccaac tcaagtattg tgtatgaggc agcggacatg atcatgcata cccccgggtg 1020
cgtgccctgc gttcgggagg gcaactcctc ccgttgctgg gtggcactta ctcccacgct 1080
agcggccagg aatgccagcg tccccactac ggcaatacga cgccatgtcg atttgctcgt 1140
tggggcggct gctttctgct ccgctatgta tgtgggagat ctctgcggat ctgttttcct 1200
tgtctcccag ctgttcacct tctcgccccg ccggcatgag acaatacagg actgcaattg 1260
ctcaatctat cccggccacg tgtcaggta ccgcatggct tgggacatga tgatgaactg 1320
gtcgcctaca acggccctgg tgggtgtcga gttactccgg atcccacaag ctatcgtgga 1380
catggtggcg ggggctcact ggggtgtcct agcgggcctt gcctactatt ccatggtggg 1440
gaactgggct aaggatttga ttgtgatgct actttttgcc ggcgtcgacg gggagaccg 1500
tgtgacaggg gggcagatag ccagaaatgc ctactcgctc acgacctct tttcatctgg 1560
gtcggctcag aacatccagc tcataaacac caacggtagc tggcacatca acaggactgc 1620
cctgaactgc aatgactccc tcaacaccgg gtttcttgcc gcgctgttct acacgcacaa 1680
gttcaacgcg tccggatgtc cagagcgctt ggccagctgc cggccattg acaagttcga 1740
tcaggggtgg ggtcccatca cttatgctga gcaggcggc caggaccaga ggccttattg 1800
ctggcactac gcacctaac catgtggtat tgtatccgcg tcgaagggtg gtgggtccagt 1860

gtattgtttc accccaagcc cagttgtagt ggggacgacc gatcggttcg gtgtccctac 1920
gtatagctgg ggggagaatg agacagacgt gctgctcctt aacaacacgc ggccgccgca 1980
aggcaactgg ttcggctgta cgtggatgaa cggcactggg ttcaccaaga catgcggggg 2040
ccccccgtgt aacatcgggg ggggcgga taacacctg acctgcccta cggactgttt 2100
ccggaagcac ccgcggcca cttacacaaa atgtggttcg ggaccttggc tgacaccag 2160
gtgcttgta gactacccat acaggctctg gcactacccc tgcactgcca actttacat 2220
cttcaagggtt aggatgtatg tagggggcgt ggagcacagg ctgatgctg catgcaattg 2280
gacccgaggg gaacgttgca acttgaggga tagggataga ttggagctca gcccgctact 2340
gctgtctaca acagagtggc aggtgctgcc ctgttctttc accaccctac cggctctgtc 2400
cactggttta attcatctcc atcagaacat cgtggacgtg caatacctgt acggtatagg 2460
gtcggcagtt gtttcctttg caatcaaagtg ggactatatac gtgatacttt tcctcctcct 2520
ggcggacgcg cgcgtctgtg cctgcttgtg gatgatgctg ctgatagccc aggccgaggc 2580
cgccttagaa aacctggtgg tcctcaatgc ggcgctcgtg gccggagcgc atggcattct 2640
ctccttcctt gtgttcttct gtgccgcctg gtacatcaag ggcaagctgg tccccggggc 2700
agcatatgct ttctatggag tatggccgct gctcctgctt ctgctggcct taccaccag 2760
agcttacgct atggagcggg agatggctgc atcgtgcgga ggcgcggtgt ttgtaggtct 2820
ggtagctttg actttgtcac catactataa agagttcctc gccaggctca tatggtgggt 2880
gcaatatttt atcaccagag ccgaggcgca cctgcaagtg tggatcccc cctcaacat 2940
tcgggggggc cgcgatgcca tcctcctcct cgcgtgtgta gtccaccag agctaattct 3000
tgacatcacc aaactcctgc tcgccatact cggtcgcctc atggtgctcc aggctagcat 3060
aactcaagtg ccgtacttcg tacgcgcca agggctcatt cgtgcatgca tgttggtgcg 3120
gaaggtagcc gggggccatt atgtccaaat ggcctttgtg aagctgaccg cactgacagg 3180
tacgtacgtt tatgaccatc taactccact gcgggactgg gccacgcgg gcctgcgaga 3240
cctcgcggtg gcagtagagc ccgttgtctt ctctgacatg gagaccaagg tcatacctg 3300
gggggcagac accgcagcgt gtggggacat tatcttgggt ctacctgtct ccgccgaag 3360
gggtagggag ataccttctg ggccggccga tagtcttgaa gggcaggggt ggcggtcct 3420
tgctcccatc acggcctatt cccaacagac gcggggccta cttggttgca tcatactag 3480
cctcacaggc cgggacaaaa accaagtcga gggggaggtt caagtggctt ccaccgcgac 3540
acaatccttc ctggcgacct gcgtcaatgg cgcgtgctgg actgtcttcc atggtgccgg 3600

ctcaaagacc ttagctggcc caaaaggtcc aatcaccag atgtacacta atgtagacct 3660
ggacctcgtc ggctggcagg cgccccccgg gtcgcgttct ctgacaccat gcacctgcgg 3720
cagctcagac ctctatattg tcacgagaca tgctgatgtc attccggtgc gccggcgggg 3780
cgacagtagg ggaagcctac tctctcccag acctgtctcc tacttgaaag gctcctcggg 3840
tggtccgctg ctctgccctt cgaggcacgc tgtgggcac ttcgggctg ctgtgtgcac 3900
ccgggggggtt gcgaaggcgg tggatttcat acccgttgaa tcaatggaaa ctactatgcg 3960
gtctccggtc ttcacggata actcatcccc cccggccgta ccgcagacat tccaagtggc 4020
ccatctacac gccctactg gcagcggcaa gagcactaag gtgccggctg catatgcagc 4080
ccaagggtat aagggtgctc tcttgaacct gtccgttgcc gctaccttg gttttggggc 4140
gtatatgtct aaggcacatg gtatcgacct caacatcaga actggggtaa gggccatcac 4200
cacgggcgcc cctattacat actccacctt cggcaagttc cttgccgacg gcggttggtc 4260
cgggggcgcc tatgacatca taatatgtga tgagtgcac tcaactgact cgactacat 4320
cttgggcatt ggcacagtcc tggaccaagc ggagacggct ggagcgcggc tcgtcgtgct 4380
cgccaccgct acgcctccgg gatcggtcac cgtgccacac cccaatattg aggaggtggc 4440
cctgtccaac gctggagaaa tccccttcta cggcaaagcc atccccattg aggtcatcaa 4500
ggggggaaga catctcattt tctgccattc caagaagaag tatgacgagc tcgccgcaa 4560
gctatcagcc ctccgactta atgctgtagc atattatcgg ggtcttgatg tgtccgtcat 4620
accgaccaac ggagacgtcg ttgtcgtggc aacagacgct ctaatgacgg gctttaccgg 4680
cgactttgac tcagtgatcg actgtaacac atgtgtcacc cagacagtcg atttcagcct 4740
ggatcccacc ttcaccatcg agacgacgac cgtgccccaa gacgcagtgg cgcgatcaca 4800
gcggcgggggt aggactggta ggggcaggag aggcattctac aggtttgtga ctccaggaga 4860
acggccctcg ggcattgtcg attcctcggc cctgtgtgag tgctatgacg cgggctgtgc 4920
ttggtacgag ctacgcctg ctgagacctc ggtaggttg cgggcttacc tgaatacacc 4980
agggttgccc gtctgccagg accatctgga gttttgggag agcgtctcca caggcctcac 5040
ccacatagat gccattttc tgtcccagac taaacaggca ggagacaact tcccctacct 5100
ggtagcatac caagccacag tgtgcgccag agctcaagct ccacctccat catgggatca 5160
aatgtggaag tgtctcatac ggctcaaacc cacgctgcac gggccaacac ccctgctgta 5220
taggctagga gccgtccaaa atgagatcac cctcacacac ccatgacca aattcatcat 5280
ggcatgcatg tcggctgacc tggaggtcgt cactagcacc tgggtgctag taggcggagt 5340

ccttgacagct ctggctgcat attgcttgac aacaggcagt gtggtcattg tgggtaggat 5400
catcttgtcc gggaggccgg ctgttattcc cgacaggga gtcctctacc gggagttcga 5460
tgagatggaa gagtgcgcct cacacctccc ttacatcgaa cagggaatgc agcttgccga 5520
gcaattcaag cagaaggcgc tcggattgct gcaaacagcc accaagcaag cggaggctgc 5580
tgctcccgtg gtagaatcca agtggcgagc ccttgagacc ttctgggcga agcacatgtg 5640
gaatttcac agcgggatac agtacctagc aggcttgtcc actctgcctg ggaaccccg 5700
gatagcatca ctgatggcat tcacagcctc tatcaccagc ccgctctcca ccagaatac 5760
cctattattt aacatctggg ggggatgggt ggctgccc aa ctcgcccc ccagtgtgc 5820
ttcggcttgc gtgggcgcgc gtatcgccgg tgcggctgtc ggcagcatag gtcttgggaa 5880
gggtgcttgtg gacatcttgg cgggatattg ggcagggggtg gctggcgcg ctcgtagcttt 5940
taagatcatg agcggcgagg tgccctccac cgaggacctg gttaaacttac tccctgccat 6000
cctctctccc ggcgccttag tcgtcggggt cgtgtgcgca gcaatactgc gtcggcacgt 6060
gggcccggga gagggggctg tacagtggat gaaccggctg atagcgttcg cctcgcgggg 6120
taaccacgtt tccccgcgc actatgtgcc tgagagcgac gctgcggcg gtgttactca 6180
gatcctctcc ggccttacca tcactcagct gctgaagagg cttcaccact ggatcaatga 6240
ggactgtcc acgcatgtc ccggttcgtg gctaagggat gtttgggact ggatatgcac 6300
gggtgttact gacttcaaga cctggctcca gtccaagctc ctgccgcggt taccgggggt 6360
ccctttcttc tcgtgtcaac gcgggtacaa gggagtctgg cggggggacg gtatcatgca 6420
gaccacctgc ccgtgtggag cacagatcac cggacatgtc aaaaacggtt ccatgaggat 6480
cgtcgggcct aaaacctgca gcagcacgtg gcatggaacg ttccccatca acgcatacac 6540
cacaggccca tgcgcaccct ccccggcgc aaactattcc agggcgctat ggcgggtggc 6600
cgctgaggag tacgtggagg ttacgcgggt gggggatttc cactacgtga cgggcatgac 6660
cactgacaac gtaaagtgcc catgccaggt tccggcccct gaattcttca ctgagggtga 6720
tgagtgcggt ttgcacaggt acgctccggc gtgcaaacc ctcctacggg aggaggtcac 6780
attccagggt gggctcaacc aatacctggt tgggtcacag ctcccatgag agcccgaacc 6840
ggatgtagca gtgctaactt ccatgcttac cgacccctcc cacatcacag cagagacggc 6900
aaagcgtagg ctggctaggg ggtctcccc ctccttggcc agttcttcag ctagccagtt 6960
atctgcgcct tccttgaagg cgacatgcac taccatcat gactccccgg acgttgacct 7020
catcgaggcc aacctcctgt ggcggcagga gatgggcggg aacatcacc gcgtggagtc 7080

agagaataag gtagtaattt tggactcttt cgatccgctc cgagcggagg aggacgagag 7140
ggaaccatcc gttgcggcgg agatcttgcg gaaaaccaag aggttcccc cggcgatgcc 7200
catatgggca cgcccggatt acaaccctcc gttgctagag tcctggaaag acccggacta 7260
cgtccctccg gtggtacacg ggtgcccgt accacctacc aaagctcctc cgataccacc 7320
cccacggaga aagaggacgg tagtcctgac agagtccact gtgtcttctg ccttggcgga 7380
gcttgctact aagacctttg gcagctccgg gtcgtcggcc gtcgacagcg gcacggcaac 7440
tgctcctccc gaccaggctt ccgacgacgg cgaccaagga tctgacgttg agtcgtattc 7500
ctccatgccc cctcttgagg gagagccggg ggaccccgat ctcagcgacg ggtcttggtc 7560
taccgtgagc gaggaggccg gtgaggacgt catctgctgc tcaatgtcct acacatggac 7620
aggcgccttg atcacgccat gcgccgcgga ggaaagcaag ttgcccatca acccgttgag 7680
caactctttg ttgcgtcacc acaacatggt ctatgctaca acatcccga gcgcaggcct 7740
acggcagaag aaggtcacct ttgacagact gcaagtcctg gacgaccact accgggacgt 7800
gctcaaggag atgaaggcga aggcgccac agttaaggct aaactcctat ccatagaaga 7860
agcctgtaag ctgacgcccc cacattcggc cagatccaaa tttggctatg gggcaaagga 7920
cgtccggaac ctatccagca aggccgttaa ccacatccgc tccgtgtgga aggacttgct 7980
ggaagacact gagacaccaa ttgacaccac cgtcatggca aaaagtgagg ttttctgcgt 8040
ccaaccagag aaaggaggcc gcaagccagc tcgccttatc gtattcccag acttgggggt 8100
tcgtgtatgc gagaagatgg ccctttatga cgtggtctcc acccttcctc aggccgtgat 8160
gggctcctca tacggattcc agtactcccc tggacagcgg gtcgagttcc tggatgaatgc 8220
ctggaaatca aagaaatgcc ctatgggctt ttcatatgac acccgctgtt ttgactcgac 8280
agtcactgag agtgacatcc gtgttgagga gtcaatttac caatgttggt acttggcccc 8340
cgaagccaga caggccataa agtcgctcac agagcggcct tacattgggg gtcccctgac 8400
caattcaaaa gggcagaact gtggctatcg ccggtgccgc gcgagtggcg tgctgacgac 8460
cagctgcggt aataccctta catgttactt gaaggcctct gcagcctgtc gagctgcaaa 8520
gctccgggac tgcacgatgc tcgtgaacgg agacgacctc gtcgtcatct gtgagagtgc 8580
gggaacccaa gaggatgagg cgaacctacg agtcttcacg gaggctatga ctaggtattc 8640
tgcccccccc ggggaccgc cccgaccaga atacgacttg gagctaataa catcatgttc 8700
ctccaatgtg tcggtcgcgc acgatgcac tggcaaaagg gtatactacc tcaccgcga 8760
cccctccacc ccccttgac gggctgcgtg ggagacagct agacacactc cagttaattc 8820

ctggctaggc aacatcatta tgtatgcgcc caccttatgg gcaaggatga ttctgatgac 8880
ccatttcttc tccatccttc tagcccagga gcaacttgaa aaagccctgg attgccagat 8940
ctacgggggc tgttactcca ttgagccact tgacctacct cagatcattg aacgactcca 9000
tggctcttagc gcattttcac tccatagtta ctctccaggt gagatcaata ggggtggcttc 9060
atgcctcagg aaacttgggg taccaccctt gcgagtctgg agacatcggg ccagaagtgt 9120
ccgcgctaag ctgctgtccc aggggggggag ggctgccact tgtggtaagt acctcttcaa 9180
ctgggcagta aggaccaagc tcaaactcac tccaatcccc gcagcgtccc agttggactt 9240
gtccagctgg ttctgtggctg gttacagcgg gggagacata tatcacagcc tgtctcgtgc 9300
ccgacccgcg tggttcatgt tgtgcctact cctactttca gtaggggtag gcatctacct 9360
gctccccaac cgataaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat ttcttttttt 9420
tttttttttt ttttttcttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 9480
ctttcttttg tttttttttt ttttcttctt tttgggtggct ccatccttagc cctagtcacg 9540
gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcatg actgcagaga gtgctgatac tggcctctct 9600
gcagatcatg t 9611

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/11, A61K31/7105, A61P31/14, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/11, A61K31/7105, A61P31/14, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED, EMBL/DDBJ/Genebank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 95/30746 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 16 November, 1995 (16.11.95), & EP 759979 A1 & JP 10-503364 A (Claims 25 to 50; sequence Nos. 20, 23)	<u>1-4, 6, 11-12</u> 5
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 7-303485 A (Tonen Corp.), 21 November, 1995 (21.11.95), (Family: none)	<u>1-4, 6, 11-12</u> 5
Y	WO 00/63364 A2 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORP.), 26 October, 2000 (26.10.00), & AU 200044721 A & EP 1171586 A2 & BR 200009884 A & KR 2001112944 A & JP 2002-542263 A & CN 1375004 A & MX 2001010618 A1 (Claims 1, 9, 42)	5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 April, 2004 (06.04.04)Date of mailing of the international search report
06 July, 2004 (06.07.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000605

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000605

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention according to claim 13 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

In the inventions as set forth in claims 1 to 6, 11 and 12, the parts other than those relating to claims 7 to 10.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000605

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

There is no chemical structure common to oligoribonucleotides having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:20 to 34 as set forth in claims 7 and 8 and oligoribonucleotides having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:47 to 55 as set forth in claims 9 and 10 but these oligoribonucleotides are common to the inventions according to claims 1 to 6 and other inventions according to claims 7 to 10 exclusively in being an oligoribonucleotide sequence-specifically binding to RNA of hepatitis C virus.

However, document 1 reports RNA molecules which are oligonucleotides substantially complementary to a part of hepatitis C virus RNA, contain a sequence selected from among a group consisting of specific SEQ ID NOS and have a length of 12 to 28 nucleotides (claims 25 to 50).

Also, document 2 reports an antisense RNA against a partial sequence of the 5'-non-translational region of hepatitis C virus genome (claim 1).

Since the RNA molecules described in the above documents 1 and 2 are oligoribonucleotides sequence-specifically binding to hepatitis C virus RNA, being an oligoribonucleotide sequence-specifically binding to hepatitis C virus RNA cannot be considered as a special technical matter in the meaning within PCT Rule 13.2.

Among the inventions as set forth in claims 1 to 12, therefore, the group of inventions relating to the oligoribonucleotides having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:20 to 32 as set forth in claims 7 and 8 and the group of inventions relating to oligoribonucleotides having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:47 to 55 as set forth in claims 9 and 10 are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but recognized as groups of 24 inventions relating respectively to 24 oligoribonucleotides different from each other.

Such being the case, there is no special technical matter common to all claims. The inventions according to claims 1 to 12 have 25 groups of inventions, i.e., in the inventions as set forth in claims 1 to 6, 11 and 12, the parts other than those relating to claims 7 to 10, and in the inventions according to claims 7 to 9 and the inventions according to claims 10 to 12 depending thereon, the parts relating respectively to 24 oligoribonucleotides represented by SEQ ID NOS:20 to 32 and 47 to 55.

Document 1: WO 95/30746 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION)
1995.11.16

Document 2: JP 7-303485 A (TONEN KABUSHIKI KAISHA)
1995.11.21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/11, A61K31/7105, A61P31/14, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/11, A61K31/7105, A61P31/14, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED
EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 95/30746 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1995. 11. 16 & EP 759979 A1 & JP 10-503364 A (請求の範囲25-50, 配列番号20, 23)	<u>1-4, 6, 11-12</u> 5
<u>X</u> Y	JP 7-303485 A (東燃株式会社) 1995. 11. 21 (ファミリーなし)	<u>1-4, 6, 11-12</u> 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 04. 2004

国際調査報告の発送日

06. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/63364 A2 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 2000. 10. 26 &AU 200044721 A &EP 1171586 A2 &BR 200009884 A &KR 2001112944 A &JP 2002-542263 A &CN 1375004 A &MX 2001010618 A1 (請求の範囲1, 9, 42参照)	5

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲13に係る発明は、人間の手術方法又は治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-6, 11-12に記載されている発明のうち請求の範囲7-10に係るものを除くもの

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄の続き

請求の範囲 7～8 に記載された配列番号 20～34 に示すヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチド、請求の範囲 9～10 に記載された配列番号 47～55 に示すヌクレオチド配列で示されるオリゴリボヌクレオチドは、互いに共通の化学構造を有するものでなく、C型肝炎ウイルスの RNA に対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドであることにおいてのみ請求の範囲 1～6 に係る発明及び請求の範囲 7～10 に係る他の発明と共通する。

しかしながら、文献 1 には、C型肝炎ウイルスの RNA の一部に実質的に相補的なオリゴヌクレオチドであり、特定の配列番号から成る群より選択される配列を含み 12～28 ヌクレオチドの長さである RNA 分子が記載されている（請求の範囲 25～50）。

また、文献 2 には、C型肝炎ウイルスゲノムの 5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンス RNA が記載されている（請求項 1）。

これら文献 1～2 に記載された RNA 分子は C型肝炎ウイルスの RNA に対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドであるから、C型肝炎ウイルスの RNA に対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドであることは PCT 規則 13.2 における特別な技術的事項であるとはいえない。

よって、請求の範囲 1～12 に記載された発明のうち請求の範囲 7～8 に記載された配列番号 20～34 に示すヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチド、請求の範囲 9～10 に記載された配列番号 47～55 に示すヌクレオチド配列で示されるオリゴリボヌクレオチドに関する発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なった 24 個のオリゴリボヌクレオチドそれぞれに関する 24 個の発明からなる発明群であると認める。

それ故に、請求の範囲の全てに共通の特別な技術的事項はなく、請求の範囲 1～12 に係る発明は、請求の範囲 1～6, 11～12 のうち請求の範囲 7～10 に係るものを除くものと、請求の範囲 7～9 及びそれら請求項を引用する請求の範囲 10～12 に係る発明のうち、配列番号 20～34, 47～55 の配列番号に係るオリゴリボヌクレオチド 24 個のそれぞれからなる発明群を全て合わせた 25 個の発明群からなるものである。

文献 1: WO 95/30746 A1, (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION)
1995. 11. 16

文献 2: JP 7-303485 A, (東燃株式会社)
1995. 11. 21